


Organizadores:
Shaft Corrêa Pinto
Michelle Frazão Muzitano


# Isolamento de produtos naturais do metabolismo secundário


Atena
Editora
Ano 2023



Organizadores:
Shaft Corrêa Pinto
Michelle Frazão Muzitano

# Isolamento de produtos naturais do metabolismo secundário

Atena
Editora
Ano 2023

**Editora chefe**
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
**Editora executiva**
Natalia Oliveira
**Assistente editorial**
Flávia Roberta Barão
**Bibliotecária**
Janaina Ramos
**Projeto gráfico**
Camila Alves de Cremo
Ellen Andressa Kubisty
Luiza Alves Batista
Nataly Evilin Gayde
Thamires Camili Gayde
**Imagens da capa**
Shaft Corrêa Pinto
**Edição de arte**
Luiza Alves Batista

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

# Isolamento de produtos naturais do metabolismo secundário


**Diagramação:** Ellen Andressa Kubisty
**Correção:** Maiara Ferreira
**Indexação:** Amanda Kelly da Costa Veiga
**Revisão:** Os autores
**Organizadores:** Shaft Corrêa Pinto
Michelle Frazão Muzitano

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

I85 Isolamento de produtos naturais do metabolismo secundário / Organizadores Shaft Corrêa Pinto, Michelle Frazão Muzitano. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1749-1
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.491232808

1. Metabolismo. I. Pinto, Shaft Corrêa (Organizador). II. Muzitano, Michelle Frazão (Organizadora). III. Título.

CDD 612.39

**Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166**

**Atena Editora**
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

## DECLARAÇÃO DA EDITORA

## AUTORES

Cristiane Catela Martins de Jesus

Daniel Luiz Reis Simas

Denise Oliveira Guimarães

Fernando Armani Aguiar

Marcos Vinicius Toledo e Silva

Michelle Frazão Muzitano

Natalie Giovanna da Rocha Ximenes

Shaft Corrêa Pinto

Thiago Barth

Willian Jonis Andrioli

Agradecemos às nossas famílias e aos mestres que nos estimularam e apoiaram em nossas caminhadas.

Agradecemos a botânica que sempre esteve ao nosso lado, Profa Dra Tatiana Ungaretti Paleo Konno (*in memoriam*).

Agradecemos aos nossos discentes que nos desafiam a melhorar a cada dia.

Agradecemos ao Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliveira, a Profa. Dra. Raquel Elisa da Silva Lopes e a Profa. Dra. Gilda Guimarães Leitão pela revisão crítica do texto.

# APRESENTAÇÃO

A inegável relevância da química de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos no decorrer da história reafirma a necessidade do constante aprimoramento dos aspectos que regem esta área do conhecimento.

A propriedade biossintética das espécies vegetais e a diversidade e complexidade estrutural de seus produtos promoveram numerosos avanços no tratamento de diversas enfermidades ao longo dos anos. O desenvolvimento de fármacos, mesmo na atualidade com o avanço da química sintética, ainda se correlaciona amplamente com o metabolismo secundário, haja vista a singularidade de seus constituintes químicos, cujas estruturas são também utilizadas como ponto de partida para processos sintéticos.

Apesar desta diversidade química ser inegavelmente relevante, a complexidade característica dos extratos de plantas torna o processo de isolamento de substâncias, uma das etapas críticas para se avaliar as propriedades farmacológicas de um constituinte e para a determinação de sua estrutura, bastante complexo.

Diante do exposto, a compreensão das técnicas para o isolamento de produtos do metabolismo secundário, desde sua fundamentação, é indeclinável e fundamental para a execução adequada de processos nesse sentido, de forma a se obter os constituintes químicos da forma mais otimizada possível em um grau de pureza elevado. Dessa forma, este livro aborda a fundamentação e aplicabilidade das principais técnicas de isolamento utilizadas, além de dissertar sobre as técnicas de maior relevância empregadas para a análise e processamento de dados na esfera da química de produtos naturais.

# PREFÁCIO

De forma brilhante e magistral, pontificou Aristóteles, há séculos atrás: “A natureza não faz nada em vão”. Com toda certeza, se o grande filósofo e cientista grego, preceptor de Alexandre da Macedônia, vivesse em nossos dias e travasse contato com este estudo afirmaria, com satisfação e entusiasmo, que o conteúdo do mesmo seria mais uma confirmação do seu singular axioma, haja vista que esta pesquisa trata das substâncias bioativas, disponibilizadas pela natureza à humanidade, nas espécies vegetais, e que são usadas para fins terapêuticos.

Nesse limiar do terceiro milênio, vivemos em um mundo globalizado no qual, cada vez mais, a humanidade se volta para a preservação da natureza. Nações Unidas, governos do mundo inteiro, organizações não-governamentais e muitas outras instituições e movimentos olham com preocupação para o meio ambiente. Fala-se constantemente em Desenvolvimento Sustentável, Transição Energética e se preconiza a utilização dos recursos naturais renováveis.

Nesse contexto, adquire uma capital importância a química dos produtos naturais. Embora antiga, pois desde tempos imemoriais, quando os homens ainda habitavam as cavernas e os curandeiros tratavam as enfermidades de seus pacientes com as poções que extraíam das plantas, esta química e seus processos são fundamentais na atualidade, proporcionando à humanidade os valiosos fármacos, com suas inúmeras propriedades terapêuticas, dentre muitos outros produtos.

Inspirados por nobres propósitos e ideais, como todos os dedicados e pertinazes pesquisadores, tal como o grande Hipócrates de Cós, ao catalogar em sua monumental obra *Corpus Hipocratium*, os remédios fitoterápicos de sua época, os autores deste trabalho apresentam aqui uma aprimorada e relevante pesquisa, realizada com instrumentação avançada e métodos e técnicas modernas, que resultaram em significativas e importantes contribuições para a ciência dos fármacos, compreendendo sua extração e isolamento.

A pesquisa científica não é uma tarefa fácil. Pelo contrário, é árdua e cansativa. Requer daqueles que se propõem a realizá-la dedicação, perseverança e esforço. Muitas vezes, nos laboratórios das universidades, os pesquisadores enfrentam a falta de recursos e tem que “tirar leite de pedra”, para prosseguir em seus trabalhos. Pertinácia torna-se, consequentemente, uma palavra-chave, ao se vestir uma bata e ir para a bancada.

Honra-nos, consequentemente, o convite que recebemos para prefaciar este livro, que aborda tão crucial pesquisa. Fazemo-lo com grande satisfação e parabenizamos a estes intrépidos e empenhados autores que concluíram seu trabalho, presenteando à comunidade científica com seus valiosos resultados.

Francisco Sávio Ximenes Aragão<br>
Engenheiro Ambiental<br>
Químico Industrial<br>
M. Sc. Desenvolvimento e Meio Ambiente.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

# INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados como alimentos, bebidas, suplementos alimentares, em medicamentos (alopáticos, homeopáticos e fitoterápicos), em cosméticos, em cosmecêuticos, em nutricosméticos, em perfumes, em defensivos agrícolas, na medicina ocidental e oriental tradicionais, bem como na medicina alternativa. Estas substâncias são utilizadas em misturas complexas presentes em extratos e frações ou isoladamente e podem ser agrupadas em diferentes classes, considerando sua origem biossintética, seus esqueletos carbônicos e funções químicas, tais como terpenoides, flavonoides e alcaloides (Emery & Marchetti, 2017).

Certamente as plantas são as fontes mais estudadas e exploradas pela Humanidade para a descoberta de novos fármacos. Dentre as diversas substâncias já isoladas, a morfina, potente analgésico isolado de *Papaver somniferum* (Papoula), é um marco importante por se tratar do primeiro produto natural isolado a ser comercializado em 1826 (Cragg *et al.*, 2014).

A contribuição dos produtos naturais para os avanços da medicina ao longo da história humana é de grande notoriedade e as necessidades de novas estratégias terapêuticas e princípios ativos é uma constante.

Devido a complexidade bioquímica e a notável capacidade biossintética das plantas e de outros organismos vivos, o resultado é a produção de extratos de grande complexidade química. Estas matrizes oferecem desafios nos processos de isolamento e obtenção dos princípios ativos, que necessitam estar em grau de pureza satisfatório para as análises de elucidação estrutural, bem como para a realização dos ensaios biológicos.

# ABORDAGENS PARA O ISOLAMENTO RACIONAL DE PRODUTOS NATURAIS

O isolamento de produtos naturais é um grande desafio para a obtenção de substâncias biologicamente ativas. Na busca racional, podemos utilizar informações obtidas através do conhecimento tradicional, das classes químicas específicas que possuam descrição sobre atividade biológica e das espécies vegetais que as produzem e de triagem, utilizando um alvo farmacológico conhecido desafiado contra substâncias aleatórias. Assim, como veremos a seguir, o fracionamento biodirigido se aplicará a qualquer que seja a abordagem escolhida a fim de obter a substância ativa. Técnicas de desreplicação, para evitar o reisolamento de substâncias conhecidas e com atividade biológica descrita, racionalizam a pesquisa visando o conhecimento sobre o perfil químico das espécies vegetais.

## 1 | FRACIONAMENTO BIODIRIGIDO

**Michelle Frazão Muzitano**

No processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento de origem natural, é conveniente o isolamento e a caracterização de substâncias ativas no extrato. No caso de um medicamento fitoterápico, esse processo é necessário para a determinação do(s) princípio(s) ativo(s) do extrato que então será(ão) utilizado(s) no processo de garantia da eficácia, segurança e qualidade do medicamento produzido (Balekundri & Mannur, 2020).

O derivado vegetal é extraído da fonte, concentrado, fracionado e purificado resultando em uma única substância ativa ou um grupo delas (fitocomplexo). A identificação de substâncias conhecidas, evitando assim a replicação de esforços anteriores, foi grandemente auxiliada por sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplados à espectrometria de massas (CLAE-EM) e bancos de dados de produtos naturais (Harvey *et al*., 2015). A determinação da estrutura de novas substâncias foi revolucionada pelos avanços nas técnicas espectroscópicas, particularmente nas tecnologias de ressonância magnética nuclear de alta resolução. Embora a determinação de estruturas complexas seja tecnicamente desafiadora, não é mais um grande impasse no processo de descoberta de fármacos. Nos casos em que o perfil de atividade biológica atende aos critérios de potência e seletividade, o processo de purificação é ampliado e novos ensaios farmacológicos e toxicológicos são conduzidos (Koehn & Carter, 2005).

Quando há interesse em uma classe específica de metabólito secundário de acordo com o seu potencial farmacológico descrito na literatura, o fracionamento de um extrato pode ser monitorado apenas quimicamente, após triagem fitoquímica. Pode também ser

feito de forma biomonitorada, para conhecer as substâncias responsáveis pelo efeito. Neste contexto, o monitoramento químico acompanha o processo, de forma a permitir escolher as técnicas de separação mais apropriadas em cada etapa (Weller, 2012). Vários ciclos de fracionamento são geralmente necessários para se obter uma substância pura. O isolamento e caracterização de várias substâncias com graus diferentes de atividade podem dar contribuições iniciais para o estudo de relação estrutura-atividade (Muzitano *et al.*, 2006).

Para o fracionamento biomonitorado, o ideal é que seja escolhido um teste simples e reprodutível e que possa utilizar pequenas quantidades de material. Após determinar o alvo terapêutico, é possível determinar um tipo de ensaio que possa ser aplicado. A preferência é que a triagem das frações e sub-frações possa ser realizada utilizando ensaios enzimáticos colorimétricos, passando posteriormente para etapas mais complexas envolvendo cultura celular, quando for o caso, antes de ensaios em animais de laboratório (Atanasov *et al.*, 2015). O fracionamento biomonitorado envolvendo exclusivamente ensaios *in vivo* deve ser evitado, sempre que possível, por questões éticas. Esta recomendação baseia-se no fato de que, durante as etapas de isolamento, um número alto de frações e sub-frações podem ser gerados, o que implicaria o uso de muitos animais. Além disso, há uma demanda de maior quantidade de amostra em ensaios *in vivo*. Porém, realizando os experimentos *in vivo* apenas com as frações ou substâncias mais promissoras *in vitro*, faz-se um uso otimizado de animais de experimentação (Fernandes & Pedroso, 2017). Quando é necessário realizar experimentos com animais logo nas primeiras etapas de pesquisa de um medicamento, é aconselhável que se gere o menor número possível de sub-frações em cada etapa de fracionamento.

Foram selecionados dois exemplos de fracionamento biomonitorado para ilustrar o tópico. No primeiro, foi dado seguimento ao fracionamento biomonitorado pela ação antileishmania de *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae), conhecido no Brasil como saião-roxo e folha-da-fortuna. Através do estudo de Muzitano e colaboradores (2006; 2009) utilizando cromatografia líquida clássica foi possível isolar cinco diferentes flavonoides da sub-fração ativa, sendo um deles, a quercitrina (3-*O*-α-*L*-ramnopiranosídeo de quercetina), a responsável pela atividade biológica do extrato aquoso. O ensaio *in vitro* em amastigotas de *Leishmania amazonensis* foi utilizado nas etapas de biomonitoramento. Após a etapa de fracionamento biomonitorado, a atividade desse flavonoide foi avaliada em modelo murino e mostrou-se eficaz nas condições avaliadas.

Num segundo estudo, o extrato da espécie *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) foi fracionado de forma biomonitorada a fim de verificar as substâncias responsáveis pelo efeito vasodilatador. No estudo de Rodrigues e colaboradores (2017), os ensaios foram conduzidos *in vitro* utilizando aneis de aorta de ratos. Glicosídeos de quercetina e de miricetina foram identificados como responsáveis pela ação vasodilatadora do extrato.

O paradigma geral da purificação guiada por bioensaio é que não há como prever

quantos ciclos de fracionamento e bioensaio serão necessários. Nos casos em que o tempo de resposta do bioensaio é demorado, o tempo para uma única rodada de fracionamento pode ser prolongado. Nos estágios iniciais da pesquisa, o tempo é crucial para que os estudos avancem para a próxima fase e atrasos devido a contratempos relativos ao bioensaio passam a ser uma limitação prática. Por esta razão, uma série de abordagens inovadoras foi avançando para criar bioensaios *on-line* que utilizam a afinidade dos ligantes naturais desejados com alvos de interesse (Weller, 2012). Uma dessas abordagens usa fluxo contínuo de reações enzimáticas que são capazes de fornecer leituras de inibição da atividade enzimática em tempo real. Nesse sistema, o eluato da CLAE é dividido em dois, um para o ensaio enzimático e outro em paralelo para um espectrômetro de massas, por exemplo. Nesse caso, a correlação de picos detectados no ensaio enzimático com a massa correspondente nos espectros fornece dados que são característicos da substância bioativa. Um exemplo de aplicação da técnica de bioafinidade em extratos vegetais, é o uso de ensaio de proteína baseado em afinidade produzido pela ligação covalente de acetilcolinesterase a esferas magnéticas, seguido por caracterização química dos ligantes seletivos para os extratos aquosos de folhas obtidos de *Lippia gracilis* (Verbenaceae). A partir dos experimentos, eriodictiol 2'-*O*-glicosídeo e eriodictiol 3'-*O*-glicosídeo foram identificados como promissores na busca por novos fármacos anticolinesterásicos (Vanzolini *et al.*, 2018). Ainda na temática de separação e ensaio acoplados, destaca-se a avaliação *on-line* da atividade antioxidante de componentes de extratos naturais através de método automático de cromatografia líquida de alto desempenho em 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH-CLAE) (Lu *et al.*, 2017). Muitos produtos naturais são ricos em antioxidantes importantes na prevenção ou retardo de uma variedade de doenças, como cardiovasculares e inflamatórias, diabetes e cânceres, ressaltando a relevância desse método.

Também cabe destacar os programas de triagem de alto rendimento (do inglês *HTS – high-throughput screening*), que permitiram a rápida triagem biológica de grandes coleções de substâncias naturais e sintéticas. Atualmente, as bibliotecas de substâncias da química combinatória são a principal fonte de programas de triagem de HTS na descoberta de fármacos. Por outro lado, a natureza continua provando ser uma excelente fonte de princípios ativos inovadores. Os metabólitos secundários de plantas, animais e micro-organismos apresentam uma diversidade estrutural marcante, destacada em programas de descoberta de fármacos (Annang *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2015). Adicionalmente, a triagem quantitativa de alto rendimento (qHTS) envolve um conjunto diversificado de ensaios bioquímicos associados à caracterização da biblioteca em termos de propriedades físico-químicas, diversidade estrutural e similaridade das substâncias em bibliotecas disponíveis publicamente. Os dados gerados são analisados usando uma variedade de ferramentas métricas e métodos estatísticos. As substâncias são então categorizadas por classe química e perfis de atividade, contribuindo com grande quantidade de informação sistematizada para a busca de novos candidatos a fármaco (Kearney *et al.*, 2018).

## 2 I PERFIL QUÍMICO E DESREPLICAÇÃO

**Daniel Luiz Reis Simas**

**Marcos Vinicius Toledo e Silva**

O desenvolvimento da Química de Produtos Naturais está diretamente relacionado ao progresso da Química Analítica, como acontece em muitas áreas da Ciência (Khan, 2018; Newman & Cragg, 2020). A partir do advento da associação da informática com os equipamentos modernos de análises químicas, surgiram abordagens que possibilitaram o acoplamento de diferentes técnicas de separação, detecção e análise. Neste sentido, os ganhos de seletividade, sensibilidade e interpretação dos dados têm levado os pesquisadores a novas formas de busca por substâncias com atividades biológicas diversas.

Tradicionalmente, a busca por metabólitos bioativos faz uso do fracionamento e isolamento de substâncias para posteriores testes biológicos (Bucar *et al*., 2012), ou de estudos bioguiados, que dão suporte à procura por substanciais ativas (Koehn, 2008). No entanto, estas abordagens podem levar ao isolamento de metabólitos conhecidos para a atividade biológica em estudo e o eventual negligenciamento das substâncias não ativas para esta mesma atividade biológica específica (Neto *et al*., 2016; Hubert *et al*., 2017). Neste cenário, surge a desreplicação que se torna uma etapa crucial nos processos de triagem de extratos brutos com potenciais aplicações biotecnológicas diversas com o objetivo principal de buscar substâncias ativas inéditas, evitando os processos de purificação de metabólitos conhecidos (Hubert *et al*., 2017). As ferramentas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas, geralmente associadas à quimioinformática, são os meios básicos nos estudos de desreplicação de extratos vegetais.

Os trabalhos em desreplicação e/ou análise de perfil químico dividem-se basicamente nos passos de obtenção da matriz biológica, preparação das amostras, seguido pela aquisição dos dados espectrais e por último do tratamento destes dados (Kim & Verpoorte, 2010). Neste caso, o tratamento dos dados é computacional, trata-se da extração dos espectros (mineração de dados), integração e exportação dos dados refinados que serão usados na desreplicação em si.

### 2.1 Extração e preparo das amostras

A preparação da amostra consiste em todos os procedimentos necessários desde a coleta até a injeção do material a ser analisado nos aparelhos de aquisição de dados (Kim & Verpoorte, 2010). A extração dos metabólitos para estudos de perfis químicos é um ponto crucial e visa a extração mais eficiente. Depois de extraídos, os metabólitos devem seguir ao preparo de amostra para as análises instrumentais. Quando os procedimentos

são realizados de maneira correta nas etapas anteriores, geralmente a única preparação necessária para as análises, consiste no ajuste da concentração e filtragem das amostras para eliminar possíveis materiais particulados que possam causar interferência (Izumi *et al.*, 2015).

Contudo, em análises por cromatografia com fase gasosa, pode ser necessário um passo adicional, conhecido como derivação e é desnecessário para amostras voláteis. No entanto, amostras menos voláteis (polares ou de média polaridade), tais como metabólitos primários, requerem este processo para se obter características químicas que os tornem volatilizáveis e termicamente estáveis (Moros *et al.*, 2017). Como exemplo, para carboidratos, a reação de derivação geralmente envolve a formação de oxima, seguido por trimetilsililação para substituir hidrogênios ativos em grupos funcionais polares e, portanto, aumentar a volatilidade pela redução de interações dipolo-dipolo ou de ligações de hidrogênio (Halket & Zaikin, 2003; Moros *et al.*, 2017).

## 2.2 Análise de perfil químico

Diversas abordagens de análise podem ser utilizadas para a obtenção de perfis químicos. O perfil metabólico é uma abordagem que visa a detecção simultânea da totalidade ou de um conjunto de metabólitos de uma amostra. Dentre as técnicas mais utilizadas para avaliação do perfil químico dos metabólitos a ressonância magnética nuclear (RMN), a cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), a cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta (CL-UV), e/ou acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) ou à ressonância magnética nuclear (CL-RMN), a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (EC-EM) dentre outras (Wolfender *et al.*, 2003; Shulaev, 2006; Izumi *et al.*, 2015).

Por razões históricas, a CG-EM é a técnica mais desenvolvida para análises de perfis metabólicos (Roessner *et al.*, 2000). Com ela é possível estabelecer os perfis de centenas de substâncias de diferentes classes químicas. Geralmente, é realizada utilizando ionização eletrônica (IE) ou *eletrospray* (ESI) como fontes de ionização e quadrupolo (Q) ou tempo-de-voo (TOF) como analisadores de massa (Fiehn *et al.*, 2000, Neto *et al.*, 2016). A principal vantagem desta técnica é a disponibilidade de bibliotecas espectrais acessíveis e sua principal limitação é a análise apenas de substâncias voláteis ou volatilizáveis por derivação química (sililação, acetilação, metoximação ou metilação).

Em contrapartida, para sustâncias não voláteis o uso de CLAE-EM é a melhor alternativa. Sua aplicabilidade vem crescendo, especialmente após o advento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que aumenta a eficiência da separação com menor tempo de análise (Pedersen *et al.*, 2009). As fontes de ionização mais comuns são o *eletrospray* (ESI) ou a ionização química a pressão atmosférica (APCI); contudo, diferentes analisadores de massa podem ser empregados com suas peculiaridades (Bouslimani *et al.*,

2014; Gaudêncio & Pereira, 2015). A resolução de trabalho do equipamento de EM é um parâmetro importante, pois analisadores de maior resolução possibilitam a determinação inequívoca das fórmulas moleculares dos sinais de interesse. Existe também a possibilidade de trabalho em *tandem*, onde sucessivas análises de massas podem gerar informações de fragmentação e importantes informações estruturais da molécula de interesse (Bouslimani *et al.*, 2014). As bibliotecas espectrais, neste caso, ainda não se mostram tão abrangentes quanto às da CG-EM, porém, a cada ano, novas bases de dados têm surgido ou se ampliado no sentido de suprir as necessidades de plataformas de consultas de dados de espectrometria de massas com APCI ou ESI e diferentes tipos de analisadores.

Uma alternativa viável para a análise de perfil metabólico é a EC-EM devido ao seu considerável poder de resolução, a necessidade de pequeno volume de amostra e a possibilidade de separar cátions, ânions e moléculas neutras simultaneamente (Soga *et al.*, 2003). Apesar disto, poucos estudos são realizados envolvendo EC e Química de Produtos Naturais.

A EM apresenta maior sensibilidade do que as técnicas de RMN. No entanto, análises por ressonância fornecem informações mais completas sobre o conteúdo estrutural, além de possuir reprodutibilidade e linearidade de resposta em análises quantitativas superiores à EM. A RMN, portanto, é ideal para análises de grandes quantidades de amostras com grande diversidade de metabólitos como, por exemplo, análises em batelada (Schripsema, 2010). No entanto, o número de substâncias detectadas é limitado a partir de uma a algumas dezenas (Krishnan *et al.*, 2005, Markley *et al.*, 2017), diminuindo sua abrangência de análise. É importante salientar que em perfis químicos obtidos através de espectros de RMN, deve-se considerar todos os sinais da substância para se obter a identificação inequívoca da mesma e evitar erros. Logo, a análise de substâncias em misturas complexas fica limitada devido à sobreposição de sinais. Para determinar com exatidão se os sinais observados são da molécula de interesse, se faz necessário o uso de padrões que, por muitas vezes, encarece o processo de análise.

Sob uma visão geral, particularmente para estudos de desreplicação e obtenção de perfil químico, as técnicas acopladas/associadas EM, $EM^n$, *Image* EM, RMN $^1H$ e $^{13}C$ 1D e 2D, a genômica, a bioinformática e a metabolômica têm sido as ferramentas mais utilizadas nos últimos anos (Gaudêncio & Pereira, 2015). Os dados são tratados e analisados através de plataformas automáticas, após ou concomitantemente a obtenção dos dados (Eisenstein, M. 2006; Ito & Masubuchi, 2014; Hubert, Nuzillard & Renault, 2017). Neste cenário, fica evidente que o planejamento experimental deve ser realizado de maneira robusta e bem definida. A plataforma de aquisição de dados deve ser compatível com a biblioteca utilizada para a varredura automática dos dados e vice-versa (Rojas-Cherto *et al.*, 2012; Gerlich & Neumann, 2013). A escolha por uma plataforma livre ou particular (que envolve custo para utilização) e se a comparação se dará em modo *offline* ou *online* fica a cargo do pesquisador.

Sendo assim, o uso de perfis metabólicos tem se mostrado uma ferramenta importantíssima para a desreplicação de extratos biológicos de diferentes naturezas, tais como plantas, bactérias, fungos, algas marinhas, e outros.

## 2.3 Abordagens e tendências em desreplicação de amostras biológicas

A Química Combinatória foi, durante aproximadamente duas décadas, a principal abordagem utilizada na busca por novas moléculas biologicamente ativas. No entanto, o baixo índice de acertos desta plataforma trouxe o foco novamente à pesquisa de descoberta e desenvolvimento de novas entidades através da Química de Produtos Naturais (Newman & Cragg, 2020). Historicamente, os metabólitos naturais são as fontes mais consistentes de ativos para fins farmacêuticos, pelo fato de que as fontes naturais produzem metabólitos de alta complexidade estrutural, com características únicas e com diversas vias de aplicação biotecnológica.

Com o objetivo de evitar o estudo e isolamento de substâncias conhecidas, a desreplicação vem se tornando a mais recente abordagem para a descoberta de moléculas biologicamente ativas. Abordagens distintas estão sendo utilizadas para desreplicar amostras biológicas de diferentes naturezas. No entanto, invariavelmente, todas utilizam a interdisciplinaridade para alcançar seus objetivos (Gaudêncio & Pereira, 2015). A CLAE-EM, com uso de bibliotecas de suporte para identificação e bases de dados, possibilita a busca por massa e fórmula molecular, padrões de fragmentação, atividade biológica e até dados taxonômicos. Esta técnica é a principal fonte de estudos de desreplicação nos últimos anos (Wolfender *et al.*, 2000; Bouslimani, *et al.*, 2014).

Uma forma de otimizar a desreplicação é a construção de *Molecular Networking*, uma ferramenta estatística que permite comparar substâncias de um determinado extrato. Embora seja muito aplicado em Genômica e Proteômica, recentemente vem sendo usada na desreplicação de metabólitos. Substâncias quimicamente semelhantes tendem a possuir espectros parecidos (Gaudencio & Pereira, 2015). Assim sendo, esta técnica correlaciona os dados espectrométricos (EM/EM) das substâncias de acordo com sua similaridade, permitindo o seu agrupamento em um mapa chamado de network (semelhante a uma grande teia), no qual substâncias similares são agrupadas próximas umas das outras em regiões conhecidas como "vizinhanças químicas" (Yang *et al.*, 2013). Esta correlação fornece ao analista uma ferramenta gráfica de visualização mais simples do que muitos espectros e o conhecimento da natureza esperada das substâncias, através da similaridade química (Wang *et al.*, 2016). Isto reduz o tempo de busca e facilita a identificação de substâncias nos bancos de dados não indexados, ampliando as chances de identificação.

O uso de técnicas rápidas para a varredura de extratos e/ou substâncias ativas como o HTS, em paralelo ou não com ferramentas de identificação de substâncias ativas, tem sido bastante empregado no cenário atual (Mishra *et al.*, 2008). Nesse sentido, técnicas

analíticas acopladas à CLAE ganham destaque e podem estar associadas a testes biológicos (Nielsen & Smedsgaard, 2003; Turnbull *et al*., 2010; Kildgaard *et al*., 2017). Para auxiliar nas identificações e guiar estudos, diversas bases de dados encontram-se disponíveis *online*, como Dictionary NPs, Antibase, MarinLit, AntiMarin, Pubchem, ZINC, NAPROC-13, NMRShiftDB, GNPS, ChEBI, ChemSpider, Kegg, IIMDB, DrugBank, Therapeutic Target Database, PharmGKB, STITCH, SuperTarget, HMDB, BMRB, MMCD, MassBank, Golm Metabolome Database, Metlin, Fiehn GC-MS Database, BML-NMR, MetaboLights database e mzCloud, disponíveis em Metabolomics Society, Inc. http://metabolomicssociety.org.

# TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ISOLAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS

A cromatografia é uma das técnicas analíticas mais empregadas para a determinação de perfis químicos (escala analítica) e purificação (escalas semipreparativa e preparativa) de produtos naturais. Ela foi introduzida no meio científico no início do século XX, através dos trabalhos pioneiros do botânico russo Michael Semenovich Tswett, em 1906. Em seu primeiro trabalho, empregando carbonato de cálcio, inulina e alumina como sólidos (atualmente, fase estacionária) e dissulfeto de carbono como solventes (atualmente, fase móvel), separou com sucesso os pigmentos (clorofila) extraídos de diversas plantas (Collins, 2009a). Neste trabalho ele introduziu o termo **adsorção** (Tswett, 1906a), que consistiu no primeiro mecanismo de separação descrito e ainda hoje empregado. Logo em seguida, com a mesma temática, publicou o segundo trabalho no qual veio a apresentar o termo **cromatografia** (Tswett, 1906b). Posteriormente, os estudos de Martin & Synge (1941) trouxeram um novo avanço, introduzindo a cromatografia líquido-líquido na separação de aminoácidos e o seu mecanismo de separação, a **partição** (Collins, 2009b), atualmente é o mais difundido.

As técnicas cromatográficas desempenham um papel de grande relevância para a obtenção de substâncias com elevado grau de pureza. São versáteis na separação e, em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria na região do UV ou a EM, permitem a identificação e a quantificação de substâncias (Collins *et al.*, 2006). As técnicas cromatográficas apresentam-se em diferentes configurações e formatos e podem ser classificadas, inicialmente, com base na forma física do sistema cromatográfico em **cromatografia planar e em coluna**. Na cromatografia planar a fase estacionária (FE) é disposta sobre uma superfície planar, enquanto na cromatografia em coluna ela é acondicionada em um tubo cilíndrico. Em ambas, a fase móvel (FM) é um líquido. A cromatografia planar pode ser realizada em papel ou em placa (cromatofolha de alumínio ou vidro) recoberta pela FE (sólida ou quimicamente ligada), conhecida como **cromatografia em camada delgada** (CCD). Na cromatografia em coluna o estado físico da FM pode ser um gás (**cromatografia com fase gasosa**, CG) ou um líquido (**cromatografia líquida** (CL) incluindo aqui a **cromatografia contracorrente** (CCC)); no caso específico desta última, ambas as fases são líquidas. A CL em coluna inclui dois grupos: a técnica desenvolvida em coluna de vidro aberta, sob pressão atmosférica, também conhecida por CL clássica (e suas variáveis cromatografia *flash* e CL a vácuo - CLV) e a técnica pressurizada/automatizada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 1 I CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

**Willian Jonis Andrioli**

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial delas sobre uma camada delgada de FE (adsorvente) imobilizada sobre uma superfície plana, eluídas pela FM (mistura de solventes). O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da **adsorção** (Tswett, 1906a). É utilizada com maior frequência na análise de extratos vegetais e frações, em virtude da simplicidade, rapidez e sensibilidade oferecidas pela técnica (Costa, 2000).

### 1.1 Fases estacionárias (adsorventes)

A FE na CCD é responsável por reter as substâncias de acordo com suas polaridades. Uma grande variedade de adsorventes, usados como FE para fins cromatográficos, pode ser adquirida para a confecção de placas no próprio laboratório (espalhamento em camadas de diferentes espessuras). Atualmente, as placas industrialmente preparadas são as mais utilizadas. Dentre os adsorventes mais utilizados estão sílica, alumina, celulose e poliamida, sendo o primeiro o mais versátil e utilizado para a separação de produtos naturais, tais como: alcaloides, flavonoides. terpenoides e esteroides pelo mecanismo de adsorção (Costa, 2000)

### 1.2 Seleção da fase móvel

A escolha correta da FE e da FM permite a separação adequada dos componentes de uma matriz complexa, mediado pelos processos de adsorção/dessorção com as moléculas da amostra. Logo, a escolha da composição da FM está condicionada à natureza química das substâncias a serem separadas e à polaridade relativa da FE (Collins *et al.*, 2006).

Em uma separação adequada em CCD, as substâncias devem se distribuir ao longo da placa de forma que fiquem resolvidas em seu terço médio, ou seja, que não se concentrem próximo à origem e nem no terço final da placa após a eluição. Com um conhecimento prévio da polaridade do analito (extrato ou fração) realizam-se testes com fases móveis (um único solvente) de baixa (*n*-hexano), média (acetato de etila) e alta polaridade (metanol). De posse dessa informação, se propõe misturas binárias (geralmente) e se repetem as eluições até encontrar à proporção que resulte na melhor separação dos constituintes na placa cromatográfica.

### 1.3 Fator de retardamento ($R_F$)

O **fator de retardamento** de uma substância, $R_F$, é um parâmetro bastante relevante

em CCD (Collins *et al.*, 2006). O $R_F$ é função do tipo de FE empregada e da FM, e é definido como a razão entre a distância percorrida pela banda da substância e a distância percorrida pelo eluente (figura.1).

Portanto: $\frac{d_r}{d_m}$, (**Equação.1**)

Onde: $d_r$ = distância (cm, mm) percorrida pela substância; $d_m$ = distância (cm, mm) percorrida pela frente da fase móvel.

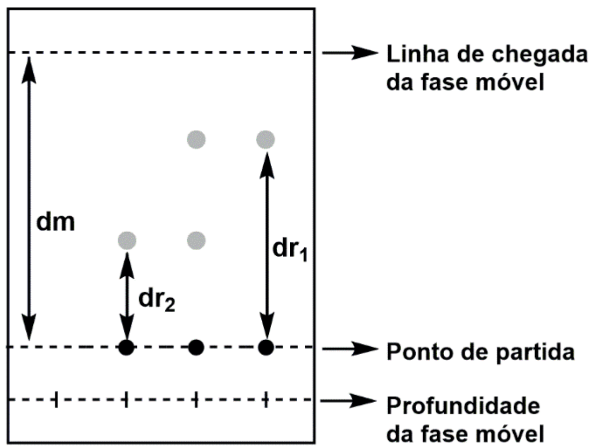



Figura 1. Ilustração do fator de retenção em cromatografia de camada delgada.

Cabe ressaltar que as condições experimentais devem ser fixadas (adsorvente, espessura, eluente etc.). Em condições estabilizadas, a velocidade de migração de cada constituinte é constante e, assim, pode-se utilizar este valor numérico para a análise de substâncias presentes em diferentes amostras, aliadas à revelação das cromatoplacas.

## 1.4 Reveladores

A revelação das cromatoplacas consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. As substâncias orgânicas com ligações duplas conjugadas (cromóforo), sobretudo com anéis aromáticos, podem ser visualizadas através da exposição da placa com indicador de fluorescência a radiação $UV_{254/365nm}$. Este método físico não degrada as amostras analisadas. Substâncias orgânicas com tais características podem também ser reveladas mediante a exposição da cromatoplaca a vapores de iodo em recipiente fechado. O iodo complexa com ligações duplas (π) e pode ser posteriormente eliminado, na maioria dos casos, através do aquecimento da placa, que pode então ser revelada com outro reagente químico. Na tabela 1 é apresentado reveladores químicos para as diversas classes de produtos naturais (Rickl & Bladt, 2009).

Tabela 1. Reveladores para a cromatografia em camada delgada

| Reveladores | Detecção |
|---|---|
| anisaldeído sulfúrico | esteroides, terpernoides |
| vanilina sulfúrica | esteroides, terpenoides, flavonoides |
| sulfato de cério (IV) | triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos etc |
| cloreto férrico | fenóis e flavonoides |
| cloreto de alumínio | flavonoides |
| ácido *p*-toluenossulfônico | catequinas, esteroides etc |
| tiocianato de cobalto (II) | alcaloides e aminas |
| reagente de Dragendorff | alcaloides |
| hidróxido de potássio a 10% de etanol | cumarinas, antronas, antraquinonas |
| ácido sulfúrico | reativo universal |
| permanganato de potássio + $H_2SO_4$ | reativo universal |
| difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP/PEG) | substâncias fenólicas |
| iodo metálico (em cuba cromatográfica) | sistema π |

## 1.5 Aplicações da CCD no isolamento de produtos naturais e da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

Dentre as modalidades cromatográficas, certamente a CCD apresenta grande versatilidade para a análise de misturas complexas e para os processos de isolamento de diferentes classes de produtos naturais. Um avanço da CCD é a CCDAE, que uma ferramenta mais robusta, simples, rápida e eficiente na análise quantitativa de produtos naturais, muito embora os custos ainda limitem seu uso em rotinas laboratoriais. Trata-se de uma técnica analítica que busca aumentar a resolução das substâncias a serem separadas e permitir análises quantitativas. Algumas das melhorias, como o uso de partículas de tamanho menor (5 $\mu$m) na FE, permitem conseguir uma melhor resolução. Quanto aos resultados do processo de separação em CCDAE, a detecção visual é adequada para análises qualitativas. Contudo, para uma análise quantitativa é necessária a obtenção de informações estruturais das substâncias separadas para a escolha do modo de detecção. Técnicas de UV-DAD, espectroscopia de fluorescência, EM, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e espectroscopia Raman têm sido aplicadas para a detecção *in situ* nas zonas de analitos em placas de CCD (Attimarad *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar a importância da CCD preparativa, que permite o isolamento de substâncias com a utilização de placas recobertas com camada de sílica gel em espessuras superiores àquelas utilizadas em placas cromatográficas analíticas (0,25 mm). Devido à maior espessura da FE que recobre a superfície do suporte (0,50; 0,75; 1,00 mm), a técnica permite a separação das substâncias com a aplicação de matrizes naturais em quantidades

superiores às praticadas em CCD analíticas. Após a eluição da amostra, a FE referente a banda cromatográfica isolada é recuperada e extraída, para a obtenção da substância pura. A seguir, são apresentados alguns exemplos do uso da CCD para a separação de classes químicas de produtos naturais.

## Terpenoides

A incorporação de reagentes aos adsorventes tem sido utilizada visando a separação de isômeros ou estruturas muito similares. Uma das misturas mais utilizadas é a sílica com 3 a 30% de nitrato de prata ($AgNO_3$) para separar substâncias insaturadas, devido à formação de complexos entre o íon $Ag^+$ e as ligações π. Pinto e colaboradores (2008) realizaram o isolamento dos sesquiterpenos siliperfol-6-eno e α-guaieno, do óleo essencial de *Anemia tomentosa*, usando placas preparativas impregnadas com $AgNO_3$ (figura 2).

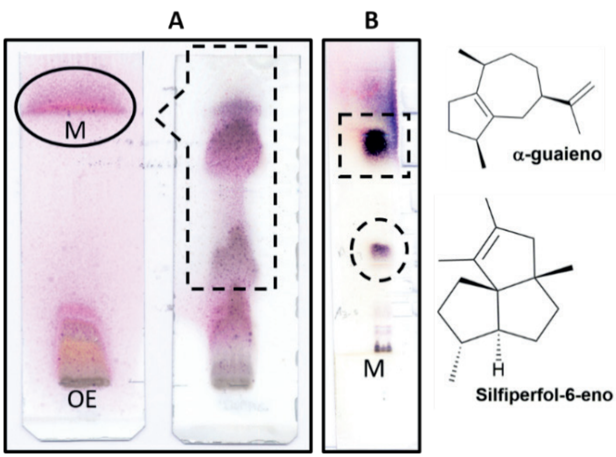
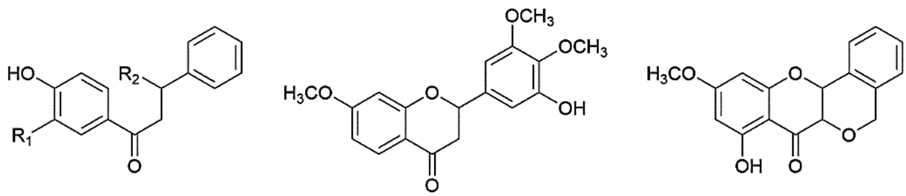



Figura 2. A) Comparação da CCD com sílica e sílica impregnada com $AgNO_3$. B) CCD preparativa com zona de concentração em placa impregnada com $AgNO_3$. OE: óleo essencial de Anemia tomentosa; M – Mistura de α-guaieno e siliperfol-6-eno

## Flavonoides

Estas substâncias fenólicas têm variadas aplicações farmacêuticas e medicinais e estão amplamente distribuídas no reino vegetal. Chen e colaboradores (2005) descreveram o isolamento de flavonoides de extratos de folhas de *Muntingia calabur*a por CCD: duas di-hidrochalconas, 2',4'-di-hidroxi-3'-metóxi-diidrochalcona **(1)**, (-)-3'-metóxi,2',4',β-tri-hidróxi-diidrochalcona **(2)**, (2S)-(-)-5'-hidróxi,7,3',4'-trimetoxiflavanona **(3)** e um novo derivado flavonol, muntingona **(4)** (figura 3). Após cromatografias usando colunas com gel de sílica, as quatro substâncias foram submetidas a uma etapa final de purificação utilizando placas preparativas de CCD com misturas binárias de solventes, nas seguintes condições: substância *1* – clorofórmio:acetato de etila 30:1 ($R_F$ 0,81); substâncias **2** e **3** –

diclorometano:metanol 2:1 ($R_F$ 0,64 e 0,81) e substância **4** – clorofórmio:metanol 45:1 ($R_F$ 0,76).




**(1)** $R_1$ = H, $R_2$= $OCH_3$
**(2)** $R_1$ = OH, $R_2$= $OCH_3$

**(3)**

**(4)**

Figura 3. Flavonoides isolados de folhas de *Muntingia calabura*.

## Alcaloides

Outra possibilidade é a separação de alcaloides em placas de sílica impregnadas com ácido. Silva e colaboradores (2007) descrevem a separação de alcaloides oxaporfínicos a partir de extratos de espécies da família Annonaceae (*Duguetia furfuracea*, *D. glabriuscula* e *Unonopsis lindmanii*) em placas de gel de sílica impregnadas com ácido oxálico a 12,1% (m/m) (figura 4).

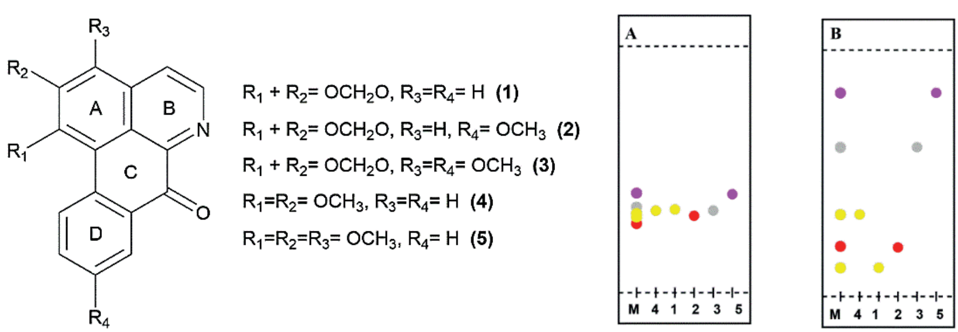



Figura 4. Separação dos alcaloides oxaporfínicos liriodenina **(1)**, lanuginosina **(2)**, oxobuxifolina **(3)**, lisicamina **(4)** e O-metilmoscatolina **(5)** em suportes de gel de sílica (1 mm de espessura): **(A)** revelador HCl 5% em etanol, eluente clorofórmio:metanol a 2%; **(B)** impregnada com ácido oxálico a 12,1% (m/m), eluente clorofórmio:metanol a 22%, sem revelação; **(M)** mistura dos alcaloides.

## 2 I CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM COLUNA

**Denise Oliveira Guimarães**

A cromatografia líquida em coluna (CL) é um método físico-químico de separação, com a FE acondicionada em um tubo cilíndrico. Existe uma grande possibilidade de combinações entre diferentes FMs e FEs em sistemas de colunas abertas, a vácuo ou

sob pressão, permitindo maior versatilidade em processos de separação (Butnariu, 2016; Collins *et al*., 2006). Desta forma, neste tópico serão abordadas a CL "clássica", realizadas em colunas de vidro a pressão atmosférica, em que a FM é impulsionada pela força da gravidade; a cromatografia *flash*, também conhecida por cromatografia de baixa ou média pressão, que opera sob pressões na faixa de 50 a 200 psi, enquanto a CLAE opera ao redor de 1000 psi; e a CL a vácuo que opera sob pressões negativas. As separações utilizando estas técnicas podem ser realizadas em escala analítica (colunas de vidro com diâmetro interno (D.I.) de 2-6 mm), preparativa (colunas de vidro com D.I. de 6-50 mm), industrial (colunas de vidro com D.I. acima de 50 mm). Adicionalmente, podemos citar o uso da técnica de coluna de microdiâmetro (colunas de vidro com D.I. de 1-2 mm) ou capilar (colunas com D.I. menor do que 1 mm), porém são pouco utilizadas na rotina de purificação de produtos naturais de origem vegetal (Collins *et al*., 2006).

## 2.1 CL "clássica"

A CL "clássica" é a forma de separação mais comum e, normalmente, é realizada em colunas de vidro preenchidas com a FE. A eluição da FM pelo sistema ocorre através da força da gravidade em modo isocrático ou gradiente. Esta técnica pode ser empregada tanto para amostras com grande variedade de constituintes químicos quanto para as semi-purificadas. A escolha do tamanho da coluna deve levar em consideração a quantidade da amostra a ser aplicada, que pode ser bem variável. As principais FE empregadas nesta técnica são: gel de sílica em fase normal (mais comum, com tamanho de partícula entre 0,063 – 0,200 mm) ou fase reversa (C-8 e C-18, principalmente), alumina, poliestireno, poliacrilamida e carboidratos (Collins *et al*., 2006).

## 2.2 Cromatografia *flash*

A cromatografia *flash* (CF) tem sido usada na separação de extratos brutos e frações semi-purificadas. É uma técnica de rápida execução e realizada em coluna de vidro adaptada com torneira ou cartuchos que podem ser adquiridos comercialmente, como Sepacore® X10, X50 de sílica, C-18, amino/diol ou alumina neutra, ácida e básica. Eles podem ser utilizados na purificação de extratos brutos vegetais em escala preparativa, em faixas que vão de gramas a quilogramas. Aplica-se pressão no topo da coluna com nitrogênio ou ar comprimido, favorecendo um influxo mais rápido do eluente pela coluna. Isto permite o uso de partículas de diâmetros menores como, gel de sílica entre 0,040 – 0,063mm, favorecendo a separação por aumento da resolução das bandas cromatográficas. É possível o emprego de sistemas mais simples, como a coluna em vidro adaptada para uso de ar comprimido (figura 5) ou o uso de sistemas mais sofisticados, como o uso de sistema de detecção na região do UV acoplada à coluna e o uso de cromatografia por fluído

supercrítico (Bucar *et al*., 2013).

## 2.3 Cromatografia líquida a vácuo

A CL a vácuo (CLV) é comparável à CCD preparativa e pode ser levada à secura após a eluição de um determinado sistema de FM para subsequente eluição ou repetição da eluição. É uma técnica simples e de fácil acesso e que tem sido considerada como estratégia de purificação para várias classes de metabólitos secundários. Ao contrário da cromatografia *flash*, que se utiliza de pressão positiva, na CLV é utilizado um sistema de vácuo (pressão negativa) para favorecer a eluição da FM através da FE, sendo possível utilizar amostras em quantidades superiores a 30 g. A FE mais comum desta técnica é o gel de sílica em fases normal ou reversa (tamanho de partícula, 5 a 40 $\mu$m), mas também pode ser utilizada com $Al_2O_3$ ou poliamida. A montagem deste sistema é feita num filtro de vidro de diâmetro de maior calibre (5-20 cm) com suporte de vidro sinterizado acoplado com bomba de vácuo e Erlenmeyer (Figura 9.5), e comprimento de 10-20 cm. Esta técnica é recomendada para fracionamentos iniciais após a obtenção do extrato bruto, bem como frações semi-purificadas (Bucar *et al*., 2013).

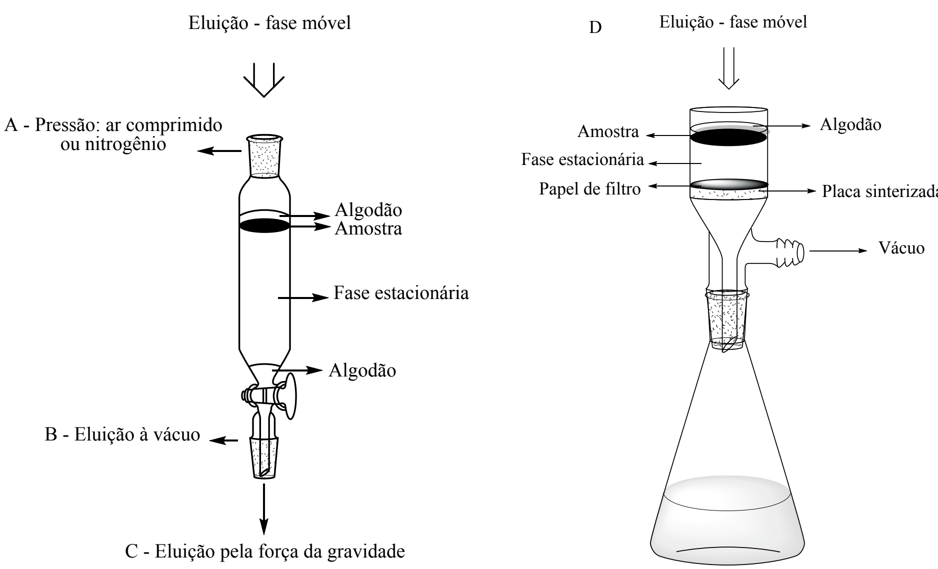



Figura 5. Colunas *flash*. (A) Sistema de pressão com ar comprimido ou $N_2$ na parte superior; coluna de baixa pressão a vácuo; (B) o sistema de vácuo fica na saída da coluna; (C) coluna sob pressão atmosférica; (D) CLV com uso de filtro com placa sinterizada e sistema de vácuo.

## 2.4 Fases estacionárias e fases móveis

O mecanismo de separação envolvido na separação depende do tipo de FE. A escolha da FM se baseia no tipo da FE a ser empregada e nas características físico-químicas

da classe química a ser isolada. Antes de realizar a escolha da técnica cromatográfica para purificação, faz-se necessária a avaliação do perfil químico de separação em escala analítica, p. ex. CCD, considerando as diversas combinações entre as FE e as FMs disponíveis. No quadro 1 são mostrados os tipos mais comuns de FE empregadas na purificação de produtos naturais por CL (Collins *et al.*, 2006; Butnariu, 2016; Çitoglu & Acikara, 2012).

Quadro 1 Exemplos de FEs e FMs mais usadas em CL para isolamento de produtos naturais e seus respectivos mecanismos de separação.

| FE | Característica da FE | Mecanismo de separação | Solventes | Tipo de substância |
|---|---|---|---|---|
| gel de sílica ($SiO_2$) | caráter levemente ácido, uma das mais usadas para purificação de PN | adsorção | *n*-hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, acetona, *n*-butanol e água | lipofílicas: ácidos graxos, terpenos, alcaloides, esteroides e outros |
| gel de sílica (fase reversa) | polar ou apolar (depende da fase ligada à sílica) | fase ligada (adsorção/ partição) | metanol, água, acetonitrila, acetona | polares: flavonoides, taninos, heterosídeos em geral |
| alumina ($Al_2O_3$) | caráter alcalino, também encontrada na forma ácida ou neutra. FE mais usada depois do gel de sílica | adsorção | *n*-hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano. | lipofílicas: alcaloides esteroidais, hidrocarbonetos policíclicos |
| silicato de magnésio (Florisil) | possui propriedades intermediárias às da alumina e sílica | adsorção | *n*-hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, acetona. | esteroides, lipídeos, glicosídeos e derivados de açúcares, carotenoides e porfirinas |
| celulose | utilizada como suporte da FE líquida por partição ou troca iônica | partição/troca iônica | solventes orgânicos misturados ou não com água | polares: fenólicas, ácidos carboxílicos, aminoácidos e outros |
| poliamida | poliamida 11 ou 6 | formação de ligações hidrogênio entre FE e FM | *n*-hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, acetona. | fenólicas e ácidos carboxílicos |
| Amberlite XAD | polimerização de estireno e divinilbenzeno de característica apolar | adsorção | etanol, água | alcaloides, apolares e polares em geral |
| Sephadex LH-20 | derivado hidropropil de dextrana entrecruzada. | exclusão | solventes orgânicos misturados ou não com água | lipídeos, hormônios, vitaminas, substâncias fenólicas |

Técnicas cromatográficas como a CL, CLV ou CF têm sido empregadas como estratégias para processos de separação de extratos brutos e purificação de substâncias orgânicas como veremos a seguir.

## 2.5 Isolamento de produtos naturais por cromatografia em coluna

Diante das inúmeras possibilidades de emprego das técnicas cromatográficas para o isolamento de produtos naturais, a escolha desta deve levar em consideração as classes de substâncias mais comumente encontradas em amostras vegetais: moléculas de baixa polaridade (ácidos graxos, terpenoides), média (substâncias fenólicas, alcaloides de baixa polaridade, diterpenos oxigenados, triterpenos, esteroides) e alta (glicosídeos, alcaloides polares, triterpenos altamente oxigenados, açúcares, peptídeos e proteínas) (quadro 2) (Collins *et al.*, 2006; Butnariu, 2016; Çitoglu & Acikara, 2012; Lopes *et al.*, 2012).

Quadro 2: Exemplos de técnicas cromatográficas usadas na purificação de classes de metabólitos secundários.

| Polaridade | Classe de metabólitos secundários | Técnicas cromatográficas mais empregadas | Tipo de sistemas cromatográficos em coluna utilizados |
|---|---|---|---|
| Baixa polaridade | Mono e sesquiterpenos | CG preparativa é a mais utilizada, porém CL em coluna e CF podem ser utilizadas | Gel de sílica com eluição isocrática em pentano, éter de petróleo, hexano ou gradiente de misturas de solventes de polaridade crescente. |
| | Carotenoides | CL | Celulose, gel de sílica, alumina, silicato de magnésio com eluentes de baixa polaridade (hexano, acetato de etila) |
| Média polaridade | Flavonoides, isoflavonas, flavanonas, di-hidroflavonois, flavonas muito metiladas ou acetiladas e flavonois | CL é de maior uso devido sua praticidade de baixo custo | Gel de sílica, poliamida, Sephadex, celulose |
| Alta polaridade | Flavonoides glicosilados | CLV | Poliamida em fase reversa e eluição com gradiente água/metanol/acetato de etila |
| | Polifenois de alto peso molecular | CL de baixa pressão | Sephadex com eluição em acetona. Etanol e metanol bons solventes para eluição/purificação de proantocianidinas |

Siglas: CG – cromatografia com fase gasosa; CL – cromatografia líquida; CF – cromatografia *flash*; CLV – cromatografia líquida à vácuo.

Os metabólitos vegetais apresentam singularidades estruturais relacionadas à presença de um ou mais centros quirais. Em muitos casos, é importante considerar técnicas que permitirão o isolamento de substâncias enantioméricas. A técnica mais comumente empregada para a purificações enantioméricas é a CLAE com o uso de colunas quirais diretamente com os respectivos enantiômeros ou indiretamente com produtos de suas

derivações (Bucar *et al.*, 2013). A volatilidade dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, e a ionização de polifenóis e alcaloides, dentre outras também devem ser consideradas no processo de isolamento.

## Terpenoides

Um exemplo de separação de substâncias de baixa polaridade é o isolamento de voláteis presentes em óleos essenciais. As análises quali/quantitativa de uma amostra de óleo essencial são feitas por cromatografia com fase gasosa e detecção por espectrometria de massas e por ionização em chama utilizando padrão de *n*-alcanos para o cálculo de Índice de Retenção Linear para, em seguida, comparar os resultados com banco de dados (Collins *et al.*, 2006). Entretanto, técnicas cromatográficas de separação podem ser empregadas na purificação dos constituintes dos óleos essenciais, como o emprego da cromatografia *flash* (Lopes *et al.*, 2012) empacotada com gel de sílica impregnada com $AgNO_3$ (2,5%) e eluída com clorofórmio para os hidrocarbonetos com insaturações.

## Alcaloides

Os alcaloides são moléculas que possuem grande representatividade na natureza e, como característica estrutural, apresentam pelo menos um grupamento amina em sua estrutura. Substâncias alcaloídicas têm uma complexa diversidade estrutural, onde seu átomo de nitrogênio apresenta-se, geralmente, com caráter básico e pode ser convertido à forma de sal quando combinado com algum ácido. O trabalho de purificação de alcaloides é bem específico e, desde a obtenção de extrato bruto, deve-se proceder a métodos de extração próprios desta classe de metabólitos. Para a purificação de produtos naturais contendo grupamento químicos possíveis de serem ionizados, como as aminas presentes nos alcaloides, podem ser empregadas resinas de troca iônica como fase estacionária em técnicas cromatográficas de coluna. Nessa forma de separação é possível monitorar o grau de interação do analito com a fase estacionária modificando o valor de pH da fase móvel. Resinas catiônicas têm sido empregadas com sucesso para a purificação de alcaloides, como exemplificado no trabalho de Chao *et al.* (2018). Neste estudo, o extrato bruto metanólico da planta *Daphniphyllum glaucescens*, após processo de extração prévia de clorofila e derivados lipídicos com hexano, foi submetido a coluna cromatográfica preenchida com resina catiônica (Dowex 50WX4) para retenção de derivados alcaloídicos, sendo possível o isolamento de novos esqueletos alcaloídicos – glaulactamas A-C.

## Flavonoides

No trabalho de Lage, 2011, a partir do extrato bruto etanólico das folhas de *Annona crassiflora* foi realizada uma partição líquido-líquido entre clorofórmio e metanol/água. A partir da fração hidroalcóolica foi possível o isolamento de derivados flavonoídicos como o peltatosídeo (glicosídeo) e (-)-epicatequina empregando-se técnicas cromatográficas sequenciais em coluna: poliamida reversa eluída com gradiente de água/metanol/acetato de etila e Sephadex® LH-20 com eluição em metanol. Para a purificação final de ambas as substâncias foi utilizado CCD preparativa com gel de sílica 60. Esse exemplo ilustra a contribuição de fases estacionárias com diferentes mecanismos de separação associado à separação por peso molecular (Sephadex® LH-20). A adsorção em fase reversa pode ser útil em processos iniciais para a purificação de extratos brutos ou frações contendo substâncias fenólicas na forma de glicosídeos ou agliconas.

## 3 | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

**Fernando Armani Aguiar**

**Thiago Barth**

A CLAE é um avanço da CL em coluna clássica (figura 6). A FE também se encontra no interior de um tubo, chamado de coluna cromatográfica (figura 6F). A diferença para a técnica pioneira é a impulsão da FM pela FE por ação de bombas de alta pressão (figura 6C) e, ao final da coluna, diversos detectores (figura 6G) podem ser usados. Ao final da cromatografia, os dados quali/quantitativos são processados (figura 6H).

As FMs (figura 6A) são compostas por solventes e, para que possam ser utilizados com este propósito, devem apresentar características como: alto grau de pureza; solubilizar a amostra sem decompor seus componentes; não dissolver a FE; ser compatível com o detector; não ser tóxico; apresentar baixa viscosidade e polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra. Outra característica importante às separações cromatográficas consiste no modo de eluição, que pode ser conduzida no modo isocrático, no qual a composição da FM é constante ao longo da análise, e por gradiente, no qual ela se modifica durante a análise. A separação por gradiente é comumente indicada para a separação de misturas complexas, pois apresenta como principal vantagem o aumento do poder resolutivo da análise.

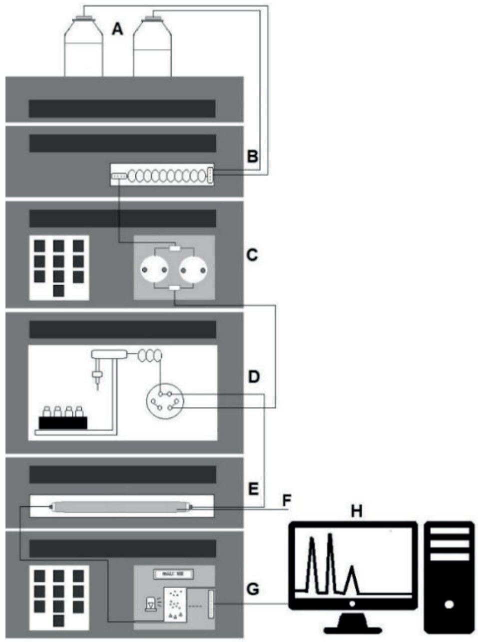



Figura 6: Representação de um cromatógrafo líquido de alta eficiência: A) reservatórios de fase móvel; B) desgaseificador; C) bomba; D) injetor de amostras; E) compartimento de colunas; F) coluna de separação; G) detector; H) processador de dados.

As colunas (figura 6F) podem ser empacotadas com diferentes tipos de partículas, que diferem em função de sua natureza química, diâmetro, forma e porosidade. O diâmetro das partículas empregadas em colunas para CLAE, atualmente, variam na faixa de 10 a 1,7 $\mu$m (Lanças, 2011). A redução do diâmetro, no intuito de aumentar a eficiência de separação em tempos reduzidos de análise, leva a aumentos de pressão superiores ao suportado por cromatógrafos convencionais. O uso de colunas empacotadas com partículas com diâmetro < 2,6 $\mu$m não são adequadas a estes equipamentos, o que levou ao desenvolvimento de cromatógrafo de ultra eficiência (CLUE), que suportam pressões superiores aos instrumentos mais comuns.

Além do tamanho da partícula, outro fator importante é sua forma, que pode ser esférica ou irregular. Quanto menor for a partícula e mais uniforme for seu diâmetro, maior será a eficiência da separação, melhorando assim o processo de difusão das moléculas da amostra. As partículas menores reduzem a distância de contato do soluto com a FE e a FM, facilitando o equilíbrio e, consequentemente, melhorando a eficiência da coluna. Além disso, estes materiais podem ser completamente porosos e peliculares (superficialmente porosos). A figura 7 apresenta uma separação comparativa de substâncias fenólicas em ambos os materiais, mostrando um ganho em velocidade de análise (menor tempo de retenção, $t_R$) mas com manutenção da eficiência de separação (número de pratos teóricos, N).

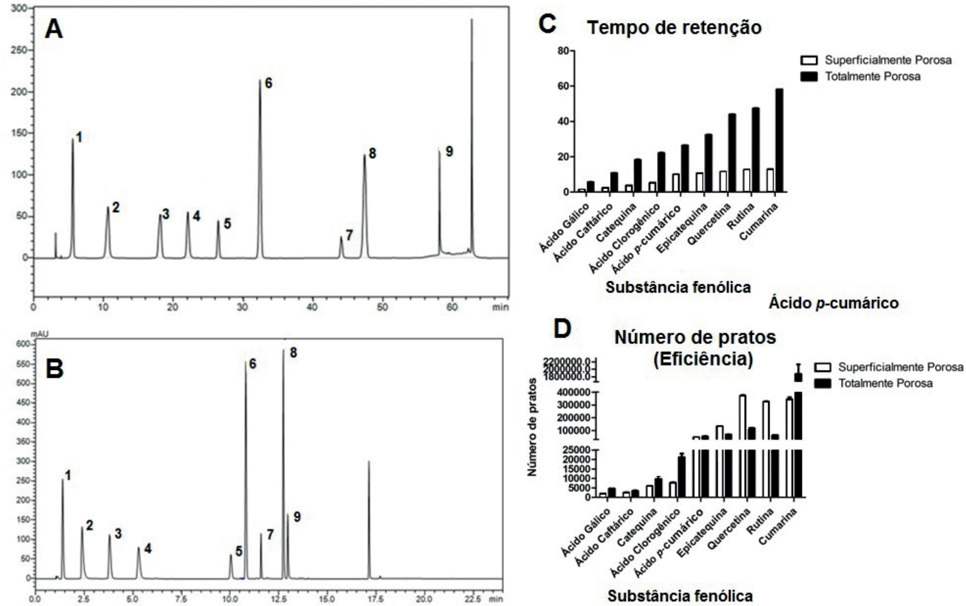



Figura 7. Análises cromatográficas empregando colunas com: **A**) partículas totalmente porosas (Nucleosil $C_{18,}$ 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$m). **B**) partículas superficialmente porosas (Ascentis $C_{18,}$ 100 x 4,6 mm, 2,7 $\mu$m). As soluções-padrão das substâncias fenólicas estão na concentração de 130 µg mL$^{-1}$: (**1**) ácido gálico, (**2**) ácido caftárico, (**3**) catequina, (**4**) ácido clorogênico, (**5**) ácido *p*-cumárico, (**6**) epicatequina, (**7**) quercetina, (**8**) rutina, (**9**) cumarina. Ambas as análises empregaram, como FM, acetonitrila e solução de ácido acético 5% e eluição por gradiente. **C**) Gráfico do tempo de retenção das substâncias fenólicas analisadas em colunas totalmente e superficialmente porosas. **D**) Gráfico do número de pratos teóricos das colunas totalmente e superficialmente porosas usadas para a análise das substâncias fenólicas.

A possibilidade de combinações de diversos materiais como FEs e a seleção de diferentes tipos de solventes como FMs, associado ao uso de diferentes detectores, torna a técnica extremamente versátil. Apesar disso, o isolamento de produtos naturais ainda é uma tarefa desafiadora. A escolha da coluna apropriada e da FM são passos cruciais. A escolha do modo de eluição (isocrática ou por gradiente) visando garantir uma boa separação e no menor tempo de análise, é igualmente importante.

Como já mencionado, a composição da FM no modo isocrático permanece constante durante toda a análise cromatográfica, este é o modo preferido de eluição por sua repetibilidade e simplicidade. Nos casos em que os componentes da mistura não podem ser separados adequadamente por este modo, pode ser necessário usar a eluição por gradiente. Isto ocorre em situações onde encontram-se misturas com componentes de solubilidades variadas, o que é frequentemente observado na análise de produtos naturais. A mudança na composição da FM, em eluição por gradiente, pode ocorrer em intervalos definidos ou de forma contínua durante toda a análise.

A otimização da eluição por gradiente é mais complexa, apresentando dificuldades

na transferência de método entre colunas, instrumentos e laboratórios, em comparação com a eluição isocrática. Além disso, podem aparecer sinais "fantasmas", maior ruído de linha de base e problemas associados à mistura de solvente, que dificultam a quantificação. Entretanto, a eluição por gradiente fornece uma análise global mais rápida, sinais mais estreitos e boa resolução (melhor separação) em comparação com a eluição isocrática, melhor precisão do $t_R$, área e altura do sinal cromatográfico (Schellinger & Carr, 2006).

No isolamento de produtos naturais, sugere-se, inicialmente, que seja realizada uma análise da mistura para avaliar o número de componentes e identificar as substâncias de maior interesse. Isto deve ser feito em escala analítica injetando-se a amostra na coluna em condições de menor força cromatográfica. Procedendo-se desta maneira os componentes da amostra que ocupam menos de 10% do espaço inicial de separação desta análise são mais bem separados por eluição isocrática, e os componentes da amostra que ocupam acima de 10% do tempo de separação inicial devem ser separados por gradiente (Schellinger & Carr, 2006).

Uma vez escolhido o modo de eluição, deve-se então selecionar a escala analítica ou preparativa. Neste ponto, a CLAE é uma ferramenta valiosa e eficiente no isolamento de produtos naturais (Snyder, 2010; Sousa *et al.*, 2012). A CLAE em escala analítica emprega em geral colunas com diâmetro interno de 4,6 mm, e envolve pouca quantidade de amostra, da ordem de microgramas, sem depender da sua recuperação. Na escala preparativa são analisadas maiores quantidades de amostra na ordem de miligramas a gramas para a obtenção de substâncias puras para elucidação estrutural ou realização de ensaios biológicos (Jin *et al.*, 2016). O que diferencia a CLAE em escala preparativa da CLAE em escala analítica é a maior carga de injeção de amostra (quantidade e volume) aplicada na escala preparativa (Feng *et al.*, 1996; Jandera *et al.*, 1997; Snyder, 2010). Isto reflete nas características das colunas cromatográficas utilizadas e leva a uma maior taxa de recuperação das substâncias. As dimensões das colunas, empregadas em escala analítica, são de 5 a 30 cm de comprimento, diâmetro interno entre 2 e 6 mm, tamanho de partículas de 3, 5 e 10 $\mu$m. Na escala preparativa o comprimento é ≥ 20 cm, diâmetro ≥ 10 mm e o tamanho de partícula ≥ 10 $\mu$m. Com relação a vazão, usam-se valores ≤ 1 mL/min em escala analítica e superiores a 3 mL/min em escala preparativa (Guillarme *et al.*, 2008; Aubin e Cleary, 2009).

## 3.1 Detectores

Estes componentes do sistema cromatográfico detectam a presença do analito na amostra após a separação. Eles medem, de forma contínua, alguma propriedade físico-química do meio (analito + FM) ou do analito. Aqueles que detectam alguma propriedade físico-química do meio são chamados de universais e os que medem alguma propriedade físico-química da(s) substância(s) presentes(s) na amostra são chamados de detectores

seletivos. Além desta primeira classificação, podem também ser classificados como destrutivos ou não-destrutivos, em relação à integridade da amostra após a análise. Os detectores ópticos por absorvância na região do ultravioleta-visível (UV-vis) e os detectores por índice de refração são exemplos de não-destrutivos que permitem o recolhimento da amostra após detecção. Por sua vez, os espectrômetros de massas são exemplos de detectores destrutivos.

Os detectores devem também apresentar algumas características desejáveis, como alta detectabilidade (limite de detecção), seletividade e operar numa faixa ampla de resposta linear para concentração/massa dos solutos, o que permite seu uso com fins quantitativos. A detectabilidade está relacionada aos níveis de ruído ocasionado por alterações de temperatura, voltagem, flutuações dos sinais elétricos, bolhas, entre outros. A seletividade, por sua vez, é determinada pelas características específicas dos analitos e na medida em que estes diferem das características da matriz da amostra (Collins *et al.*, 2006).

Os detectores mais empregados em CLAE, tanto em escala analítica como preparativa, para detecção de produtos naturais são aqueles na faixa eletromagnética do UV-vis, espectrômetro de massas, de índice de refração e de espalhamento de luz.

## Detecção por absorvância no ultravioleta e no visível

Estes detectores utilizam-se das propriedades eletromagnéticas de absorção dos analitos nos comprimentos de onda no UV-vis. A absorção medida em um determinado comprimento de onda segue a lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon bc \quad \textbf{(Equação 2)}$$

Em que "ε" é a absortividade do analito, "b" é o comprimento do caminho óptico e "c" é a concentração do analito. Seu uso é adequado para moléculas que possuem cromóforos capazes de absorver radiação luminosa neste intervalo de comprimento de onda (UV-vis: 190 – 800 nm) (Skoog *et al.*, 2009). Existem três tipos de detectores por absorvância:

- <u>Fotométrico</u>: funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos. A maior parte destes detectores opera em comprimentos de onda de 254 e 280 nm.

- <u>Espectrofotômetro de comprimento de onda variável</u>: com este detector é possível selecionar o comprimento de onda mais adequado para a detecção do analito na faixa de 190 – 800 nm, porém não é possível armazenar informações espectrais das substâncias analisadas.

- <u>Espectrofotômetro com arranjo de diodos</u>: este detector permite análises em diferentes comprimentos de onda, simultaneamete, gerando cromatogramas tridimensionais mostrando a absorvância em função do comprimento de onda e tempo de retenção. Assim, possibilita a obtenção de espectros de absorção na região do UV-vis para cada analito da amostra, além de fornecer informações sobre

a presença de substâncias coeluindo por meio de medidas de pureza de sinal. Este detector desempenha importante papel na análise de produtos naturais fornecendo informações estruturais preliminares (Collins *et al.*, 2006).

## Detecção por índice de refração

O detector por índice de refração é uma importante ferramenta para a análise de substâncias que não apresentam cromóforos. Ele mede a diferença no índice de refração do eluente que sai da coluna, contendo os componentes da amostra, e a FM pura. Sua resposta é universal, contanto que o índice de refração da substância analisada seja diferente do da FM. Ele apresenta reduzida detectabilidade e, dentre outras limitações, é também sensível a variações de vazão, temperatura e composição de fase móvel, limitando seu emprego em eluições em modo isocrático. Apresenta aplicações analíticas limitadas, porém muito empregado em análises preparativas (por não ser destrutivo) (Wolfender, 2009).

## Detecção por espalhamento de luz

Estes detectores baseiam-se na evaporação da FM por um fluxo de gás inerte aquecido, na maioria das vezes nitrogênio. Em seguida, as partículas sólidas resultantes do analito, não volátil, passam através de um feixe de luz de laser, espalhando-o e, assim, gerando uma redução da intensidade do feixe de luz que atinge o fotodiodo. A grande maioria das substâncias analisadas por CLAE respondem a este detector, porém sua sensibilidade pode diminuir para analitos voláteis. Nestes detectores, sua resposta está relacionada com a quantidade de analito presente, não às suas propriedades espectrais. Assim, ele é empregado na detecção de analitos termicamente estáveis e é considerado um detector quase universal. Apresenta, como aplicação, a detecção de substâncias que não apresentam cromóforos, assim como o detector por índice de refração (Wolfender, 2009).

## Detecção por espectrometria de massas

A combinação da CLAE com a espectrometria de massas (CLAE-EM) é uma ferramenta de grande poder qualitativo e quantitativo, pois possui alta detectabilidade e seletividade. Além de gerar dados de massa molecular dos solutos, eles são capazes de identificar massas e proporções de fragmentos destes solutos, gerando um espectro de massas. A EM é uma técnica rápida e de alta sensibilidade que permite a análise da composição química de uma determinada substância isolada, ou de diferentes substâncias em misturas complexas com baixíssimas concentrações, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica (carregadas positiva ou negativamente), conhecida

como razão massa/carga (m/z). Um espectrômetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de ionização, analisador de massas e detector (Lanças, 2009).

A ionização é um processo de conversão de um átomo ou molécula em um íon (positivo ou negativo). Dependendo da fonte ionizadora empregada os produtos podem ser formados através de um dos três processos químicos principais, como: remoção/adição de um elétron resultando em íons radicais ($M^{+\cdot}$ ou $M^{-\cdot}$); protonação/desprotonação, gerando moléculas protonadas ($[M+H]^+$)/desprotonadas ($[M+H]^-$); e cationização/anionização, que resulta em moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$)/anionizadas ($[M+Cl]^-$). As fontes de ionização mais empregadas em sistemas de CLAE-EM são *eletrospray* (ESI), ionização química à pressão a atmosférica (APCI) e ionização por fótons à pressão atmosférica (APPI). Dentre estas formas de ionização branda, o modo de ionização por ESI é o mais utilizado na análise de uma variedade de moléculas polares ou iônicas, termolábeis ou com massa molecular elevada (>1000 Da). A ESI é geralmente empregada associada a separações cromatográficas por fase reversa, em vazões baixas de FM. Opera tanto em modo de ionização negativo (ESI−) como positivo (ESI+), sendo o primeiro geralmente mais eficiente para a ionização de substâncias de caráter ácido e o segundo, para as básicas. A segunda fonte mais usada, a APCI, é empregada nas análises de substâncias de polaridade baixa a intermediária e com massa inferior a 1500 Da. Utiliza faixa de temperatura alta (300-400 °C) para dessorção térmica dos analitos, apresenta aplicabilidade tanto em fase normal como por fase reversa e sua capacidade de ionização é diretamente proporcional à vazão da FM. Finalmente, a APPI é a fonte de ionização mais recente empregada em CLAE-EM e, diferente das demais, é aplicada nas análises de substâncias apolares ou de polaridade muito baixa. Semelhante à APCI, a APPI é aplicável em fase normal e reversa, preferencialmente em vazões baixas de FM. Esta técnica de inonização não é recomendada para substâncias termolábeis (Lanças, 2009; Da Silva; Collins, 2011).

Outro componente importantíssimo do espectrômetro é o analisador de massas, que consiste em um ambiente sob um campo elétrico com a função de separar os íons e direcioná-los ao detector de acordo com os seus valores de m/z. Dentre os analisadores mais comumente empregados estão o quadrupolo (Q), armadilhas de íons (*ion trap*), por tempo-de-voo (TOF) e *Orbitrap®*. Os dados obtidos a partir de cada um deles apresentam diferentes aplicabilidades. Os analisadores quadrupolo e *ion trap* têm baixa resolução, ou seja, os íons detectados são diferenciados por uma única unidade de massa atômica (Lanças, 2009). O TOF e o *Orbitrap®* são de alta resolução e, assim, é possível distinguir os íons com precisão superior a quatro unidades de massa atômica, o que permite a determinação da fórmula molecular exata do analito (Wolfender, 2009). A análise por EM é empregada, na maioria das vezes, em escala analítica com finalidade qualitativa para a elucidação estrutural dos produtos naturais. Para seu emprego no monitoramento de uma separação em escala preparativa, pequenas frações do fluxo devem ser desviadas para o interior do espectrômetro de massas, por dois motivos principais: Primeiro, as fontes de

ionização não toleram vazões superiores a 0,5 mL/min e, em segundo, pela detecção ser destrutiva.

## 3.2 Principais mecanismos de separação usados em CLAE

Um conhecimento prévio das características físico-químicas destas substâncias é vital para a escolha da FM e FE, pois os tipos de interações dos analitos com as fases irão definir a separação. Para isso, serão abordados aspectos básicos dos principais mecanismos usados nas separações de produtos naturais e que regem as separações em CLAE, a saber:

### Cromatografia por adsorção

Também conhecida como cromatografia líquido-sólido, cujo mecanismo de separação baseia-se na competição entre os componentes polares da amostra e da FM pelos sítios polares ativos da FE. As FEs usadas nesta cromatografia são a sílica e a alumina e como FMs geralmente misturas de solventes orgânicos de média (acetato de etila) e baixa polaridade (*n*-hexano). Neste mecanismo, quanto mais polar for uma substância mais ela irá interagir com a FE e maior será seu tempo de retenção. Apresenta como séria desvantagem a alta retenção de substâncias com alta polaridade.

### Cromatografia por partição

Esta também é conhecida como cromatografia líquido-líquido e caracteriza-se por uma FE líquida com suporte sólido (geralmente gel de sílica). As separações fundamentam-se na distribuição ou partição da substância entre dois líquidos imiscíveis nos quais o analito apresenta diferentes solubilidades. Durante o processo, a substância mais polar ou hidrofílica irá preferir o líquido mais polar e a substância menos polar, ou hidrofóbica, irá preferir o líquido menos polar.

A distribuição de uma substância entre dois líquidos imiscíveis obedece a uma razão entre concentrações da mesma em cada uma das fases, e consiste na *Lei de Distribuição de Nernst* (Dean, 2009) (**Equação 3**).

$$K_D = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \quad \textbf{(Equação 3)}$$

Onde $K_D$ é o coeficiente de distribuição, $C_{org}$ é a concentração da substância no líquido apolar $C_{aq}$ é a concentração da substância na fase aquosa. Assim, quanto mais solúvel o analito for na FE, mais retido ele ficará e vice-versa e a principal desvantagem deste mecanismo é devida ao líquido da FE ser rapidamente solubilizado pela FM, levando a problemas na separação.

## Cromatografia com fase ligada

Este tipo de cromatografia busca resolver a instabilidade das FEs na cromatografia líquido-líquido e a excessiva retenção de substâncias altamente polares na FE da cromatografia por adsorção. Para isto, foram desenvolvidas FEs ligadas covalentemente (ao invés de suportadas) a grupamentos da superfície de um sólido, geralmente gel de sílica, eliminando o problema da solubilidade da FE na FM e, dependendo da polaridade do grupo ligado ao suporte, a excessiva retenção do analito.

O mecanismo deste tipo de cromatografia é considerado misto, pois é semelhante ao de partição. Entretanto, também há influência de grupos polares do suporte ou da própria FE, podendo ocorrer adsorção dos analitos. Colunas com FE do tipo ligada (principalmente com os grupos C18, C8, C4, ciano, fenil, aminopropil) são as mais usadas em análise e purificação de produtos naturais.

As características que justificam o emprego de colunas empacotadas com FEs ligadas na análise e purificação de produtos naturais incluem: diferentes seletividades, alterando-se a natureza química dos grupos funcionais ligados, permitindo a existência de FEs de alta, média e baixa polaridades; e resistência mecânica a altas pressões e versatilidade de uso em condições de fases reversa e normal. Na fase normal a FE é mais polar que a FM, e em relação à eluição, as substâncias mais apolares são eluídas primeiro, enquanto os polares são retidos pela FE e são eluídos depois. Em fase normal, geralmente são utilizadas como FE o gel de sílica e a sílica ligada a grupos polares, como aminopropil e ciano, enquanto as FMs geralmente empregam misturas de alcanos (hexano e heptano) e álcoois (etanol, isopropanol e metanol). Em fase reversa, no entanto, a FE é menos polar que a FM e, portanto, as substâncias polares são eluídas primeiro e as mais apolares posteriormente. Em fase reversa são predominantemente usadas como FEs sílica ligadas a grupos apolares, como alcanos (C18 e C8), e misturas de água, metanol e acetonitrila como FMs.

## Cromatografia com interação hidrofílica (CIH)

A CIH foi desenvolvida para contornar situações em que os mecanismos de adsorção ou de fase ligada normal falham por excesso de retenção de substâncias hidrofílicas ou em situações de baixíssima retenção na coluna por mecanismo de fase ligada reversa. Em CIH são empregadas as mesmas colunas de fase ligada normal (ciano, aminopropil) ou mesmo de adsorção (gel de sílica) e FMs compostas por misturas minoritárias de água e tampão em elevadas concentrações de solventes orgânicos (metanol, acetonitrila). A ordem de eluição é semelhante à fase normal: quanto mais polar o analito, maior seu tempo de retenção.

### Cromatografia por troca iônica

Nesta cromatografia a FE é um trocador iônico e suas interações com os íons das amostras são mediadas por forças eletrostáticas e é usada para a separação de íons e de substâncias ionizadas. Quanto maior as forças eletrostáticas entre FE e analito, maior é a sua retenção na coluna.

### Cromatografia por exclusão molecular

Em cromatografia por exclusão molecular a separação se baseia na diferença entre os tamanhos das substâncias dos componentes da amostra. Para que este mecanismo ocorra são empregadas FEs porosas. Desta forma, as substâncias maiores têm menor poder de penetração nos poros da FE e, por isso, são eluídas mais rapidamente que as substâncias que têm menor tamanho que, por sua vez, conseguem penetrar mais profundamente nos poros da FE. Geralmente, é utilizada para moléculas de massas moleculares média a alta.

## 3.3 Análise por CLAE das principais classes de produtos naturais

### Alcaloides

Os alcaloides são produtos naturais nitrogenados e, devido a isso, apresentam-se como bases fracas. Desta forma, dependendo do pH do meio, podem apresentar-se ionizados ou não. As separações cromatográficas de substâncias de caráter básico são especialmente desafiadoras, pois frequentemente geram problemas de cauda em sinais cromatográficos, baixa eficiência de separação e problemas de reprodutibilidade entre colunas. Estes problemas são observados principalmente para mecanismos de fase ligada, especialmente em fase reversa. Neles, a maioria das colunas são preparadas empregando partículas de sílica como suporte, em que a seus grupos silanóis ácidos (pKa ≈ 3) são ligados a diferentes siloxanos. Porém, uma pequena parcela dos silanóis não reagem com os siloxanos, sendo chamados de residuais e, por serem ácidos, interagem prejudicialmente com substâncias básicas protonadas, levando a separações com baixa eficiência e sinais cromatográficos assimétricos. A interação entre o silanol residual ($SiO^-$) e os analitos básicos protonados ($BH^+$) é apresentada na equação 4 (Snyder *et al.*, 2010).

$$SiO^- + BH^+ \leftrightarrow SiO^- \, BH^+$$ (**Equação 4**)

As separações cromatográficas de alcaloides em escala analítica são realizadas, geralmente, em fase ligada reversa. O mecanismo de adsorção é raramente empregado pela interação exacerbada da sílica com as substâncias básicas, enquanto o modo CIH é ainda pouco difundido.

As separações por fase reversa envolvem estratégias que buscam reduzir ou prevenir as interações das substâncias básicas com os silanóis residuais básicos. Estas estratégias envolvem: a) uso de FMs em pHs baixos (< 3,0) suprimindo a ionização dos silanóis residuais; b) uso de FMs em pHs altos (> 8,0), suprimindo a ionização dos alcaloides (estas duas estratégias devem ser avaliadas com cuidado, visto que as colunas cromatográficas convencionais de fase ligada são estáveis na faixa de pH de 2–8); c) adição de reagentes de par iônico (pentanossulfonato ou heptanossulfonato de sódio) à FM; d) adição de modificadores básicos (dietilamina ou trietilamina) à FM, que atuam bloqueando os silanóis residuais ou suprimindo a ionização; e) emprego de colunas especialmente desenvolvidas pela reação dos silanóis residuais com siloxanos de cadeia curta, num processo conhecido por capeamento, do inglês *endcapping*. As principais colunas usadas são as de fase ligada a alcanos como C8 e, especialmente, C18. Porém, para explorar interações do tipo dipolo-dipolo em alcaloides aromáticos, colunas ligadas a grupos fenila e ciano são interessantes e pouco exploradas.

As separações preparativas empregam FMs compostas por metanol ou acetonitrila e água com rara presença de aditivos, no intuito de prevenir a contaminação das amostras. Os aditivos usados, em geral, são ácidos voláteis como o trifluoracético, o acético ou o fórmico (Petruczynik, 2012).

A detecção de alcaloides envolve o emprego de diversos detectores que dependem da aplicação e presença de cromóforos nas moléculas dos alcaloides analisados. Em escala analítica, empregam-se principalmente os detectores no UV-vis, EM e, menos frequentemente, de espalhamento de luz. Por sua vez, em escala preparativa, são preferencialmente usados detectores não destrutivos, como o UV-vis e índice de refração; no entanto, detectores destrutivos como o EM e o de espalhamento de luz podem também ser empregados mediante divisão do fluxo, em que uma parte do eluato é direcionada para o detector e outra para a coleta de frações (Wolfender, 2009; Petruczynik, 2012).

## Substâncias fenólicas

Esta classe compõe um grande grupo de produtos naturais que apresentam como característica em comum a presença de anéis aromáticos hidroxilados em suas estruturas. Neste grupo estão incluídos os ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides, lignanas, cumarinas e taninos. Além disso, grande parte deles apresentam várias hidroxilas, conferindo a eles características ácidas. Neste tópico serão enfatizados os mecanismos e as técnicas de detecção empregados na separação e detecção de flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, aqui tratados genericamente de substâncias fenólicas.

As separações cromatográficas de substâncias fenólicas empregam, como principal mecanismo de separação, a cromatografia de fase ligada reversa e, além disso, vem ganhando importância o mecanismo CIH e será também discutido.

Os métodos que empregam o mecanismo de fase reversa nas separações de substâncias fenólicas são realizados quase sempre com adição de ácidos, na faixa de pH de 2–4, a fim de evitar a ionização das funções fenólicas. O controle do pH na região ácida é geralmente feito pela adição de ácidos como acético, fórmico, fosfórico ou trifluoracético, bem como com tampões citrato ou acetato de amônio. Os solventes orgânicos mais empregados são a acetonitrila e o metanol; em alguns casos, etanol, tetraidrofurano e 2-propanol também podem ser empregados, porém devem ser usados com atenção devido a serem mais viscosos que os primeiros e geram aumentos consideráveis de pressão no sistema cromatográfico. O modo de eluição, devido à complexidade das amostras, é quase sempre por gradiente. As colunas mais usadas são as empacotadas com partículas C18, que exercem sua seletividade por meio de interações hidrofóbicas (Khoddami *et al.*, 2013). Contudo, a fim de fornecer uma seletividade complementar, FEs mais polares como as ligadas a grupamentos cianopropila, diol, fenila ou mesmo bifenila, que promovem interações dipolo-dipolo com os anéis aromáticos das substâncias fenólicas.

A CIH tem sido bastante usada, associada à fase reversa, especialmente nas separações de substâncias fenólicas muito polares, cuja retenção em fase reversa é pequena ou inexistente. As FEs empregadas são divididas em três grupos: neutras, carregadas e zwitteriônicas. As FE neutras (diol e amida) não apresentam interações eletrostáticas, as carregadas (sílica e aminopropila) desenvolvem interações eletrostáticas e as zwitteriônicas (sílica sulfobetaína) apresentam interações eletrostáticas fracas com os analitos. A seletividade e a retenção de substâncias fenólicas são afetadas pela proporção do solvente orgânico, tipo e concentração do tampão usado e pH, que altera a ionização tanto da FE como dos analitos. As substâncias ionizadas são mais polares que suas formas neutras e, portanto, exibirão maiores retenções em CIH. Com relação às proporções, maiores quantidades de solventes orgânicos aumentam a retenção de substâncias polares (Pyrzynska & Sentkowska, 2015).

A detecção das substâncias fenólicas ocorre no UV-vis. Os flavonoides, por exemplo, possuem espectros característicos no UV, com dois máximos de absorção: entre 240 e 285 nm (banda II) e entre 300 e 400 nm (banda I). As antocianinas e antocianidinas apresentam a banda I com máximo de absorção entre 465 e 550 nm e a banda II, de baixa intensidade entre 270 e 280 nm.

Em escala analítica, com finalidade de quantificação e caracterização estrutural, a EM vem sendo muito empregada usando diversos analisadores e ionização, principalmente pelo modo *eletrospray* negativo (Wolfender, 2009; Khoddami et al., 2013).

## Terpenoides

Neste grupo amplo de substâncias se incluem monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides e carotenoides. Sua característica comum é a rara

presença de funções ionizáveis, sendo lipofílicos, neutros e muitos deles voláteis. Em geral, não apresentam cromóforos, exceção aos pigmentos carotenóides e alguns esteróides, o que impede a detecção da maioria por UV. Por serem majoritariamente voláteis, são frequentemente analisados por CG.

A separação de terpenoides por CLAE em escala preparativa vem sendo realizada por mecanismos de adsorção, principalmente por cromatografia de fase reversa ligada. Os métodos de separação pelo mecanismo de adsorção empregam colunas empacotadas com FE de sílica e alumina e FM composta por *n*-hexano ou éter de petróleo em mistura com acetona, tanto em modo de eluição isocrático como gradiente. As separações por fase reversa empregam misturas de solventes miscíveis com água, por exemplo: metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano como FM e eluição tanto em modo isocrático como gradiente. As FEs mais usadas são as de sílica ligadas a *n*-alcanos, C8 e principalmente C18. Os métodos preparativos empregam detectores de espalhamento de luz ou UV em comprimentos de onda na faixa de 200-220 nm, exceção aos carotenoides que absorvem na faixa de 300 a 500 nm, e na escala analítica acrescenta-se uso da detecção por EM (Cimpan & Gocan, 2002; Cserháti & Forgács, 2001).

## 4 I CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

**Cristiane Catela Martins de Jesus**

**Natalie Giovanna da Rocha Ximenes**

**Shaft Corrêa Pinto**

A Cromatografia Contracorrente (CCC) é uma técnica cromatográfica baseada na partição líquido-líquido do soluto em um sistema de solventes imiscíveis. Neste, a FE é retida no equipamento sem o uso de matrizes porosas ou adsortivas, como na CLAE. Isso se deve ao movimento das colunas estabelecido por sua configuração e/ou ao campo de força centrífuga gerado pela rotação delas.

Craig, em 1944, introduziu o primeiro equipamento para CCC, que foi denominado de aparelho de distribuição contracorrente de Craig. Ele consistia em uma série de funis de separação acoplados entre si e a um eixo de rotação que, quando girado, promovia a mistura dos solventes e a transferência da fase superior (móvel) de um sistema bifásico para o tubo seguinte (Figura 8). Posteriormente, Craig e Post (1949) desenvolveram o primeiro aparelho automatizado comercial de distribuição contracorrente.

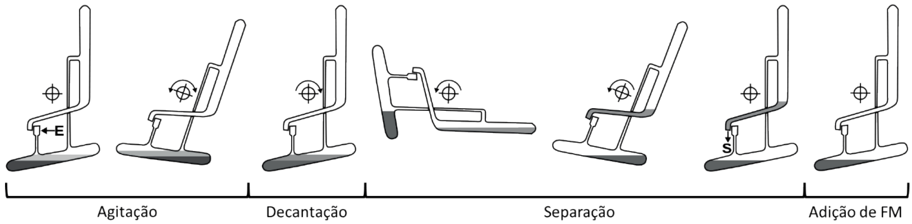



Figura 8. Aparelho de distribuição Contracorrente de Craig. E – Entrada, S – Saída.

Em 1970, Tanimura, Pisano, Ito e Bowman desenvolveram a CCC de gotículas. Neste tipo de equipamento, cerca de 300 tubos de vidro verticais (diâmetro interno de 2 mm) são interconectados por um tubo capilar de politetrafluoretileno (PTFE). A FM passa na forma de pequenas gotículas pela FE contida nos tubos pela força gravitacional. Se a FM for a fase superior (FS) no sistema de solventes bifásico, esta deve ser bombeada pela base do tubo inicial (modo ascendente), se a FM for a fase inferior (FI), mais densa, esta será bombeada pelo topo do tubo inicial (modo descendente) (figura 9).

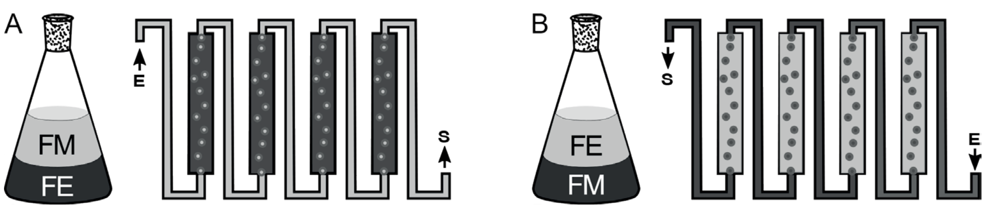



Figura 9. CCC de gotículas, modo ascendente ↑ e modo descendente ↓. E – Entrada, S – Saída.

Ito e Bowman desenvolveram a CCC de rotação locular (Ito & Bowman, 1970). Neste equipamento a coluna possui uma série de pequenas câmaras ou lóculos interligados dispostas ao longo de um eixo de rotação no qual o conjunto fica inclinado. A rotação favorece o processo de partição e praticamente não há força centrífuga atuante, como nos equipamentos mais modernos.

A CCC moderna, denominada CCC centrífuga de partição (ou CPC) se divide em dois tipos: hidrostática e hidrodinâmica (Berthod *et al.*, 2009). Os primeiros possuem apenas um eixo de rotação (centrífuga), enquanto os hidrodinâmicos possuem dois eixos de rotação (centrífuga planetária). Os aparelhos hidrostáticos possuem colunas formadas por discos entalhados com pequenas câmaras conectadas por um pequeno canalículo, estes discos são sobrepostos a fim de formar um conjunto de câmaras distribuídas circularmente em torno do eixo da centrífuga (Berthod *et al.*, 2009) (Figura 10).

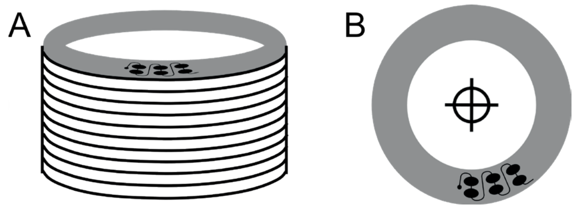



Figura 10. Coluna de CPC. A – discos sobrepostos; B – disco isolado com detalhes das câmaras com modelo células gêmeas (Twin cells®).

Os modos de eluição são denominados da mesma forma que para as CCC de gotícula e de rotação locular (figura 11).

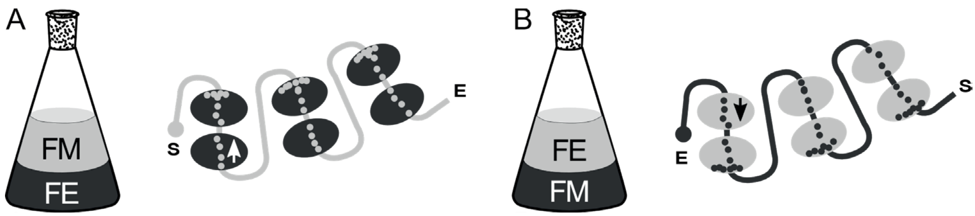



Figura 11. CPC. A – modo ascendente ↑; B – modo descendente ↓. E – Entrada, S – Saída.

Os equipamentos de CCC hidrodinâmico, de alta velocidade – **HSCCC**, de alta performance – **HPCCC** e de ultra-performance – **UPCCC** possuem colunas espirais de PTFE (baseada no princípio do parafuso de Arquimedes) em uma bobina que gira em torno do seu próprio eixo e do eixo principal da centrífuga (Berthod *et al*., 2009). A configuração da coluna espiral em múltiplas camadas tipo J somada a rotação centrífuga planetária aplicada nesses equipamentos permite que uma grande parte da FE se mantenha retida nela, enquanto a FM se misture (zona de mistura) e se separe da FE (zona de separação) ao longo da coluna realizando numerosas partições (Ito, 2005) (figura 12). A entrada da fase móvel na coluna do equipamento é feita através do *flying lead*, que conecta a coluna à bomba e ao detector/coletor de fração. Quando a FM for a FS do sistema a eluição ocorrerá no sentido cauda-cabeça, ou seja, a entrada de solvente será feita pela cauda, e a saída será pela cabeça. Quando a FI for a FM, o sentido de eluição será cabeça-cauda (figura 12).

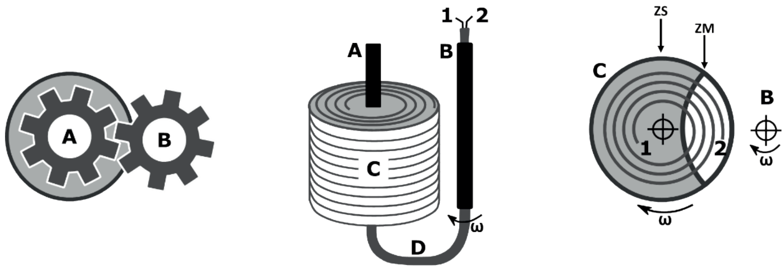


Figura 12. A – Eixo de rotação; B – Eixo de revolução; C – Bobina com coluna espiral em múltiplas camadas tipo J; D – *flying lead*: 1 – cabeça; 2 – cauda; ZS – zona de separação; ZM – zona de mistura.

Os cromatógrafos de HSCCC, HPCCC e UPCCC diferem-se pela força G aplicada pela rotação da centrífuga, respectivamente, 80-150G, 250G+ e 350G+, e são constituídos por bomba para solventes (isocrática ou gradiente), coletor de frações e pode ter ou não um detector acoplado (ELSD, UV, EM etc.). Os equipamentos de CCC possuem colunas com volumes de ~20 mL a 100 L com diâmetros internos que variam de ~1 a 30 mm de acordo com o volume da coluna, abrangendo as escalas analítica, preparativa e industrial. Neste capítulo enfatizaremos HSCCC/HPCCC.

## 4.1 Teoria básica de Cromatografia Contracorrente

O mecanismo de separação da CCC é o de partição, na qual uma substância irá se distribuir entre duas fases imiscíveis compostas por dois ou mais solventes. Logo, o coeficiente de distribuição (ou coeficiente de partição), $K_D$, permitirá prever o comportamento de determinada substância ao longo da eluição (Berthod *et al.*, 2009). Como ambas as fases dos sistemas bifásicos podem ser utilizadas como FM ou FE na CCC, e estes sistemas podem ser aquosos ou não aquosos, o $K_D$ é obtido conforme a equação 5.

$$K_D = \frac{Cs}{Cm} \quad \textbf{(Equação 5)}$$

Em que *Cs* é a concentração da substância na FE e *Cm* é a concentração da substância na FM. Logo, substâncias com $K_D$ menores terão mais afinidade com a FM.

O $K_D$ pode ser determinado em teste de partição em tubo de ensaio (Liu *et al.*, 2015). A amostra é dissolvida no sistema de solventes bifásico sob agitação vigorosa e o tempo de separação das fases não pode ser superior a 30s. As fases são separadas e as substâncias que compõem a amostra são quantificadas em ambas para a realização do cálculo do $K_D$. Valores de $K_D$ menores que 0,5 implicam perda de resolução do sinal, enquanto valores superiores a 2 implicam tempos de retenção longos e alargamento do sinal. Portanto, a substância de interesse deve ter o valor $K_D$ entre 0,5 e 2 (Ito, 2005). Para a CCC, o fator de separação, α, é calculado pela razão entre os $K_D$ entre dois componentes adjacentes

(Berthod *et al.*, 2009) e deve ser maior ou igual a 1,5 para uma boa separação, conforme a equação 6.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}, \text{ sendo } K_2 > K_1 \text{ (**Equação 6**)}$$

## 4.2 Escolha do sistema de solventes bifásico

A escolha do sistema de solventes bifásico é o fator limitante na CCC. Emulsões não poderão ser formadas na presença da amostra e os sistemas são escolhidos com base nas características físico-químicas das substâncias presentes na amostra, tais como polaridade, solubilidade, acidez/basicidade, habilidade em formar complexos etc.

A estratégia mais utilizada para a escolha de sistema de solventes é a realização de triagem empírica utilizando o teste de partição em tubo de ensaio (Liu *et al.*, 2015). Para tal escolha, numerosos testes de partição são realizados com os sistemas bifásicos de solventes de acordo com a polaridade da substância alvo. Conhecendo a natureza da amostra, o analista pode realizar buscas direcionadas à classe de substâncias para obter um direcionamento sobre qual sistema usar para os ensaios iniciais. Como veremos a seguir, existe sistematizações de famílias de solventes, que poderão ser utilizadas de acordo com a polaridade das substâncias.

A estratégia de escolha de sistema de solventes semiempírica busca diminuir o número de testes de partição utilizados para determinar a mistura de solventes ideal para o isolamento da substância alvo. Esta estratégia pode identificar o sistema de solventes adequado substituindo as experiências de partição, parcial ou totalmente, por métodos para prever os valores de $K_D$ e/ou usar relações matemáticas que utilizam um pequeno número de valores de $K_D$ determinados experimentalmente para predizer o ponto de partida (Liu *et al.*, 2015).

Outras estratégias empíricas, semiempíricas e teóricas são descritas no trabalho de Liu e colaboradores (2015), sendo a estratégica empírica a mais utilizada para a escolha dos sistemas. Dentre as famílias de sistemas de solventes bifásico sistematizadas e utilizadas estão: Oka, constituída por hexano:acetato de etila:metanol:*n*-butanol:água (Oka, Oka & Ito, 1991); Arizona, por heptano:acetato de etila:metanol:água (Margraff, 1994); HeMWat, por *n*-hexano:acetato de etila:metanol:água (Friesen & Pauli, 2005); EBuWat, por acetato de etila:*n*-butanol:água (Ito, 2005); ChMWat, por clorofórmio:metanol:água (Oka, Oka & Ito, 1991), etc.

## 4.3 Tipos de eluição em CCC

A CCC é bastante versátil no que diz respeito aos modos de eluição. A escolha do modo de eluição é realizado com base no perfil da amostra e nos resultados obtidos a partir

da escolha do sistema de solventes bifásico.

A eluição isocrática é o tipo mais básico de experiência que utiliza apenas uma FM. Já a eluição em gradiente emprega duas ou mais fases móveis com composição ligeiramente diferente para abranger uma faixa de polaridade mais ampla de substância. Este modo pode ser linear, com mudança constante e crescente da polaridade da fase móvel, ou não linear, onde são escolhidas as proporções das fases móveis a serem utilizadas e consequentemente a polaridade (Huang et al., 2016).

Na eluição com modo duplo (*dual-mode*), a FM é comutada no meio da corrida, ou seja, a FM se torna a FE e vice-versa, de modo que as substâncias com forte afinidade com a FE original também possam ser separadas. Ao mesmo tempo, o sentido de bombeamento da fase móvel também deve ser trocado (Huang et al., 2016).

Na eluição com extrusão (*Extrusion Elution CCC*), a separação é iniciada da mesma maneira que na isocrática. Contudo, quando a corrida atingir um certo ponto (p. ex. $K_D$ = 1,0), a FM será trocada para a FE extrudar o conteúdo da coluna. Isto eleva a resolução das substâncias com maior retenção e com $K_D$ maiores, diminuindo assim o tempo de análise pois apenas um volume de FE equivalente ao volume da coluna é necessário para extrudar totalmente o conteúdo da coluna. Outra vantagem da EECCC é que, ao final do experimento, o instrumento é carregado com FE e fica pronto para outra eluição (Huang *et al.*, 2016).

A eluição com refinamento por zona de pH é aplicada no isolamento de substâncias ionizáveis, que se diferencia das demais pela amostra ser introduzida na coluna juntamente com a FM. Isto ocorre por ser utilizado um agente de retenção dissolvido na FE que tem a mesma natureza (básica ou ácida) da substância-alvo. O agente de deslocamento, dissolvido na FM, tem característica antagônica à do analito: se ele for básico, o agente de deslocamento é ácido (Huang *et al.*, 2016).

## 4.4 Aplicações da CCC no isolamento de produtos naturais.

### Terpenoides

Os terpenoides constituem uma grande classe de metabólitos secundários formados a partir de unidades isoprênicas. Estes hidrocarbonetos possuem uma grande variedade estrutural, podendo ser lineares, cíclicos e/ou aromáticos, com funções oxigenadas ou não. Estas substâncias são classificadas quanto à sua polaridade, geralmente como apolares ou de baixa a média polaridade. Os sistemas de solventes bifásico usados no isolamento destes metabólitos serão baseados em *n*-hexano:acetonitrila (ou *n*-hexano:metanol) ou *n*-hexano:acetato de etila:metanol:água, dentre outros.

No estudo de Chen e colaboradores (2011), os monoterpenos cuminaldeído e *p*-menta-1,4-dien-7-al foram isolados a partir do óleo essencial de *Cuminum cyminum* L.

utilizando o sistema bifásico composto por *n*-hexano:metanol:água (5:4:1, v/v/v), modo cabeça-cauda (fase normal). Yan e colaboradores (2005) utilizaram, para os sesquiterpenos germacrona e curdiona, o sistema éter de petróleo:etanol:éter dietílico:água (5:4:0,5:1, v/v/v/v). Este sistema mostrou eficácia para o isolamento destes constituintes do óleo essencial dos rizomas de *Curcuma wenyujin* com elevado grau de pureza. Apesar das semelhanças estruturais entre cuminaldeído e *p*-menta-1,4-dien-7-al, e entre germacrona e curdiona, a CCC foi capaz de isolá-los com eficiência.

Na separação do óleo essencial dos frutos de *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehd., Xie e colaboradores (2008) isolaram o sesquiterpeno *β*-cariofileno com alto grau de pureza. Nessa separação foi utilizado o sistema *n*-hexano:diclorometano:acetonitrila (10:3:7).

## Substâncias fenólicas

Estas moléculas possuem uma ou mais hidroxilas fenólicas ionizáveis e podem ser isolados por CCC convencional ou por refinamento por zona de pH. Em sua maioria, os isolamentos de flavonoides se dão por CCC convencional (Costa & Leitão, 2010).

No estudo de Wei e colaboradores de 2012, o ácido clorogênico foi isolado de *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (*F. bidentis*) utilizando a metodologia de refinamento por zona de pH. Para tal, foi utilizado o sistema de solventes bifásico éter metil-*terc*-butílico:acetonitrila:*n*-butanol:água (4:1:1:5, v/v/v/v). O ácido trifluoracético foi adicionado à FE orgânica como agente de retenção e o hidróxido de amônio à FM como agente de deslocamento, sentido cabeça-cauda (modo reverso).

## Alcaloides

Estes produtos naturais possuem átomos de nitrogênio que conferem a eles basicidade, gerando sais hidrossolúveis na presença de ácidos. Esta propriedade é utilizada para o isolamento destes metabólitos naturais utilizando a estratégia de refinamento por zona de pH.

No estudo de Vieira e colaboradores (2013), os alcaloides indólicos 3α-aricina, isoreserpilina e 3 β-reserpilina foram isolados a partir do extrato em diclorometano de *Aspidosperma rigidum*. Nesta separação foi utilizado o sistema bifásico éter metil-terc-butílico:água; para as substâncias 3α-aricina e isoreserpilina, utilizou-se a trietilamina como agente de retenção na FE orgânica e ácido fórmico como agente de deslocamento na FM aquosa; para a reserpilina, trietilamina e ácido clorídrico. Por se tratar de substâncias básicas, os alcaloides são mantidos na FE orgânica na forma de base livre (não ionizada), sendo ionizados e particionados quando na presença do ácido (orgânico ou mineral), formando um sal hidrossolúvel.

Existem inúmeras proporções de solventes para o isolamento de produtos naturais descritos na literatura. A tabela 2 compila alguns destes sistemas com os respectivos

modos de eluição para demonstrar a versatilidade da CCC.

Tabela 2 – Produtos naturais isolados por CCC e seus respectivos sistemas.

| Substâncias | Sistema de solventes | Proporção | $K_D$ | Vazão mL/min | rpm | $S_F$ | Modo | Equipamento | Referência |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,8-cineol<br>curcumol<br>curdiona<br>curzerena<br>germacrona<br>β-elemeno | éter de petróleo:acetonitrila:acetona | 4:3:1 | 1,94<br>0,56<br>0,33<br>1,74<br>0,76<br>0,53 | 2,5 | 1700 | 85 | reverso | HPCCC | Dang *et al.*, 2010 |
| 4 ,5-dimetóxi-6,6-dimetilpiranoisoflavona<br>6α,12α-desidro-deguelina<br>deguelina<br>tephrosina | hexano:acetato de etila:metanol:água | 1:0,8:1:0,6 | 1,24<br>2,32<br>1,55<br>0,78 | 2,0 | 850 | 70 | reverso | HSCCC | Ye *et al.*, 2008 |
| ácido clorogênico | acetato de etila:*n*-butanol:água | 1:1:2 | 0,96 | 1,5 | 850 | 51 | reverso | HSCCC | Cui *et al.*, 2011 |
| α-ciperona | hexano:acetato de etila:metanol:água | 1:0,2:1.1:0,2 | 1,20 | 2 | 800 | 66 | reverso | HSCCC | Shi *et al.*, 2009 |
| afzelina<br>astragalina<br>cernidina<br>kaempferol-3-*O*-α[apiofuranosil-(1→2)]-α--ramnopiranosídeo<br>kaempferol-3-*O*-α[apiofuranosil-(1→2)]-β-galactopiranosídeo | *n*-butanol:diclorometano:metanol:água | 3:7:3:4 | 0,41<br>0,58<br>2,22<br>0,75<br>1,83 | 1,5 | 1200 | 86,6 | reverso | HPCCC | Ramos & Oliveira, 2017 |
| α-turmerona<br>β-turmerona<br>*ar*-turmerona | heptano:acetato de etila:acetonitri-la:água | 9,5:0,5:9:1 | 1,92<br>1,66<br>0,78 | 6 | 550 | 79 | reverso | HSCCC | Zhou *et al.*, 2017 |
| quercetina-7-O-rutinosídeo<br>quercetin-3-O-rutinosídeo<br>ramnosil-kaempferol | hexano:acetato de etila:metanol:água | 0,6:4,0:1,0:0,05:1,0 | 1,3<br>α 1<br>α 1 | 2 | 850 | 86 | normal | HSCCC | Leitão *et al.*, 2005 |
| hispidulina<br>homoplantaginina<br>nepetina<br>nepetina-7-glucosídeo | hexano:diclorometano:metanol:água | 0,5:4:3:2 | 0,25<br>2,19<br>0,53<br>4,02 | 8,0 | 500 | 75,8 | duplo | HSCCC | Li *et al.*, 2014 |
| galangina<br>4'-metóxi-kaempferol | éter de petróleo:acetato de etila:metanol:água | 0,8 :1:1: 0,8 | 0,88<br>1,45 | 2 | 850 | 74 | reverso | HSCCC | Fang *et al.*, 2018 |
| albiflorina<br>paeoniflorina | acetato de etila:*n*-butanol:água | 3:2,5:5 | 0,82<br>1,26 | 1,5 | 860 | 69,6 | reverso | HSCCC | Huang *et al.*, 2013 |
| ansamitocina P-3 | hexano:acetato de etila:metanol:água | 0,6:1:0,6:1 | 1,40 | 1 | 1950 | 84 | reverso | HPCCC | Yao *et al.*, 2010 |

## 5 | CROMATOGRAFIA COM FASE GASOSA

**Fernando Armani Aguiar**

**Marcos Vinicius Toledo e Silva**

**Shaft Corrêa Pinto**

Uma variação da cromatografia em coluna é a com fase gasosa (CG), que é destinada à separação de substâncias voláteis ou volatilizadas por meio de sua distribuição diferencial entre a FE (que pode ser um sólido ou um líquido) e a FM (um gás). A vazão do gás é constante durante a separação e carreia as substâncias ao longo da FE, sendo o mecanismo de separação favorecido pela interação dos analitos e FE. Os cromatógrafos a gás, cuja representação geral encontra-se na figura 13, são compostos basicamente de injetor, forno (onde a coluna está localizada), detector e estação de trabalho. Embora não façam parte do aparelho propriamente dito, o cilindro de gás e suas linhas são indispensáveis ao seu funcionamento (Ali *et al.*, 2009).

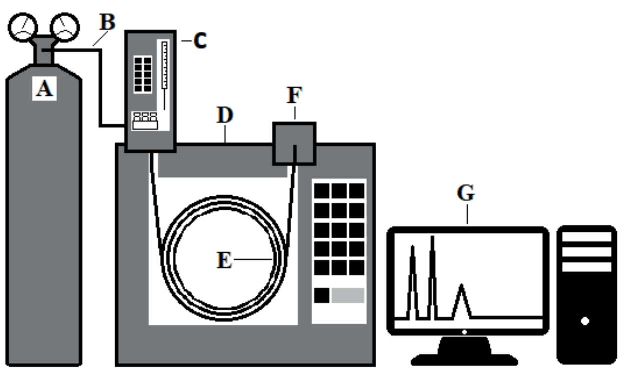



Figura 13. Representação de um cromatógrafo a gás. A – Cilindro de gás de arraste (FM); B – linha de transporte do gás; C – injetor; D – forno, onde está contida a coluna cromatográfica (E); F– detector; G – computador para controle do equipamento e processamento de dados.

A CG foi criada inicialmente para ser uma técnica preparativa. Suas primeiras descrições demonstraram o interesse em separar e purificar amostras de gases e substâncias voláteis e, assim, obter frações isoladas e puras dos constituintes (Adlard, 2003). Hoje, contudo, é mais empregada como técnica analítica, notadamente na química de produtos naturais e na indústria farmacêutica, principalmente no controle da qualidade de matérias-primas de origem vegetal (Ho *et al.*, 2018) e nas análises de óleos essenciais, pela alta resolução e baixos limites de detecção que podem ser conseguidos na separação e análise de misturas complexas de substâncias. Em produtos naturais, a CG é a técnica de escolha para a análise de frações voláteis e óleos essenciais (Dragalin *et al.*, 2016).

## 5.1 Colunas

Uma vez que a coluna é o local onde a mistura de substâncias é separada, é necessária que sua escolha seja racional e adequada às necessidades da análise. Os parâmetros envolvidos na sua escolha são: tipo de coluna, diâmetro, comprimento, tipo e espessura de revestimento.

Os dois principais tipos de coluna em CG são:

**Empacotadas:** mais calibrosas e de menor comprimento que as colunas capilares, são menos eficientes. Entretanto, permitem maior carga de amostra e análises mais rápidas (Lobiński *et al*., 1999). São preenchidas com suporte sólido (cromatografia gás-sólido) ou revestidas por um líquido não volátil no suporte sólido (cromatografia gás-líquido) (Ali *et al*., 2009). Atualmente, seu uso é mais restrito ao modo preparativo.

**Capilares:** menos calibrosas e mais longas do que as colunas empacotadas. Apresentam maior eficiência e melhor resolução, embora mais sujeitas à sobrecarga Lobiński *et al*., 1999). O revestimento é feito por uma fina camada de líquido não volátil (cromatografia gás-líquido). Como a coluna é apenas revestida, há um espaço totalmente aberto no interior da coluna. Por isso, também são chamadas de colunas tubulares abertas. Seus parâmetros são:

1) O <u>diâmetro interno de coluna</u>, que se relaciona tanto à eficiência quanto à quantidade de amostra passível de ser analisada. Diâmetros menores (por exemplo, de 0,15 – 0,3 mm) levam a análises mais rápidas, com melhor separação, porém podem levar a uma maior possibilidade de sobrecarga. O aumento do diâmetro interno (p.ex. 0,5 mm) leva a um efeito contrário: menor eficiência e maior tempo de análise, porém permitindo a injeção de uma quantidade maior de amostra (Reid & Synovec, 2008). Um dos problemas do aumento do diâmetro interno é que a vazão de gás necessário para a análise pode impedir o uso da espectrometria de massas como ferramenta de detecção.

2) O <u>comprimento da coluna</u>, ligado à qualidade da separação. Colunas maiores (acima de 50 m) apresentam maior resolução e são melhores para separar misturas complexas. Porém, o aumento do comprimento leva a aumento de pressão do sistema, e a um tempo maior de análise. Colunas menores (de 5 a 30 m) tem efeito inverso (Grob & Barry, 2004).

3) A <u>natureza química da FE</u>, intimamente ligada à capacidade de separação dos analitos da mistura. As colunas mais utilizadas em CG são de baixa polaridade, com revestimentos do tipo 100% dimetilpolissiloxano e 5% difenil/95% dimetilpolissiloxano, que separam diversas classes químicas, tais como: óleos essenciais, solventes residuais, impurezas de solventes, entre outras. Em produtos naturais, ela é muito usada para a análise de monoterpenos, sequiterpenos e fenilpropanoides, constituintes de óleos essenciais.

Determinações mais específicas, porém, podem demandar colunas com FE direcionadas ao analito. As mais polares, como as compostas por 100% de polietilenoglicol,

são utilizadas na análise de álcoois e aldeídos presentes em bebidas como a aguardente. Colunas com FE composta por 14% cianopropilfenil/86% dimetilpolissiloxano, por sua vez, separam pesticidas organoclorados.

Um caso específico é o das colunas quirais, que permitem a separação de enantiômeros. São utilizadas, na FE, substâncias capazes de interagir de maneira diferente com cada enatiômero, como os derivados de α-, β- ou γ-ciclodextrina. São empregadas na indústria farmacêutica e bioquímica para controle de insumos e/ou produtos acabados ou mesmo para a separação de enântiomeros (Schurig, 2001).

4) A espessura da FE: os filmes mais finos (p.ex. 0,1 a 0,5 µm) são ideais para substâncias muito voláteis e permitem tempos de retenção mais curtos, temperaturas mais altas e menor sangramento de coluna; contudo, permitem menor capacidade de carga nas colunas. Filmes mais espessos (p.ex. 1-10 µm) são melhores para substâncias com maior ponto de ebulição, permitem maior capacidade de carga (característica importante no isolamento) e fornecem elevada resolução para substâncias de baixo peso molecular. No entanto, são sujeitos a maior "sangramento", levam a um maior tempo de retenção e necessitam de temperaturas de operação mais baixas (Blumberg, 1999, Grob & Barry, 2004).

A espessura deve ser otimizada junto com o diâmetro da coluna para um melhor resultado. Comumente, colunas com diâmetros menores e filmes de espessura mais fina (como as capilares) são melhores para separação de misturas complexas e detecção por EM, enquanto colunas de maior diâmetro e maior espessura de FE (empacotadas) são melhores para análises com maiores cargas de amostragem, como para escala preparativa.

## 5.2 Detectores

A cromatografia, por si só, é apenas uma técnica de separação. Sem o auxílio de um detector, não há a geração de um sinal a ser analisado. Os detectores modernos utilizados em CG permitem a análise das mais diversas substâncias, de maneira eficaz e reprodutível. Sua escolha dependerá da necessidade do analista. O equipamento pode contar com apenas um detector, ou vários acoplados. Mesmo com esta possibilidade, a escolha pode recair sobre um detector que seja mais indicado para as análises desejadas, garantindo uma resposta satisfatória e poupando custos, tanto de aquisição quanto de manutenção.

Os detectores mais utilizados em CG são descritos a seguir:

1) O detector por ionização em chama (*Flame Ionization Detector* - FID) é considerado como quase universal, desde que o analito seja ionizável nas condições do detector. Seu uso é bastante difundido, principalmente por sua aplicação na análise de substâncias orgânicas. É sensível, robusto, com grande faixa de linearidade e de custo de aquisição e manutenção relativamente baixos. Porém, trata-se de um detector destrutivo. Na análise de produtos naturais, é utilizado na detecção e quantificação de constituintes de óleos essenciais, de ácidos graxos e outras substâncias voláteis/volatilizáveis (Hussain *et al.*, 2013), além de ser o sistema de

escolha para métodos que exigem robustez e um custo mais baixo.

2) A espectrometria de massas, apesar de ser uma técnica analítica independente, é comumente acoplada à CG. Ela é universal e possui limite de detecção que permite a análise de substâncias em baixas concentrações. Quando utilizada uma fonte de ionização eletrônica (EI), este detector fornece o espectro de fragmentação do analito e os softwares de CG-EM modernos vêm equipados com bibliotecas de fragmentação, auxiliando na identificação das substâncias. Já a utilização de uma fonte de ionização química (CI) favorece a observação do íon molecular, que traz informações importantes sobre a massa da molécula do analito intacta (Lai & Fiehn, 2018). Contudo, apresenta altos custos de aquisição e manutenção em relação aos outros detectores normalmente usados em CG. A detecção por EM é mais usada para análise de perfil e identificação dos constituintes de frações voláteis e de óleos essenciais, especialmente em amostras desconhecidas, como será discutido mais adiante.

Outros detectores são utilizados em CG, como o termiônico, por fotoionização, e por condutividade térmica. No entanto, possuem usos mais específicos e menos difundidos na área de produtos naturais.

## 5.3 Processo de identificação de substâncias voláteis (uso da série de *n*-alcanos para cálculo de índice de retenção linear)

Os espectros de massas obtidos após análise por CG-EM podem ser comparados através de bases de dados. No entanto, a simples sobreposição dos espectros não garante sua identificação correta, uma vez que pode haver isômeros e isóbaros que apresentem espectros de massas similares. A coinjeção com padrões conhecidos pode ser utilizada para facilitar a identificação. Entretanto, este tipo de análise é mais custoso e, por vezes, não existem padrões comerciais para todas as substâncias presentes em amostra de produtos naturais. Assim, uma análise mais aprofundada do índice de retenção se faz necessária. O índice de Kováts é a normalização dos tempos de retenção dos constituintes voláteis em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos ($C_6$-$C_{30}$) desenvolvida por Ervin Kováts em 1958. Cada *n*-alcano recebe um valor, que corresponde ao número de carbonos multiplicado por 100 (no caso do octano, por exemplo, 800). O índice da amostra é então calculado de acordo com os *n*-alcanos entre os quais seu sinal foi observado, a uma temperatura constante e em uma determinada FE.  Para tal cálculo usa-se a equação 7, abaixo:

$$IK = \frac{log(t_R X) - log(t_R Z)}{log(t_R Z+1) - log(t_R Z)} + 100Z \quad \textbf{(Equação 7)}$$

Em que *IK* = índice de Kováts; $t_R X$ = tempo de retenção da substância X; $t_R Z$ = tempo de retenção do *n*-alcano Z eluindo antes da substância X; $t_R Z+1$ = tempo de retenção do *n*-alcano eluindo após a substância X; n: número de átomos de carbono do n-alcano Z.

Os valores obtidos pelos n-alcanos serão sempre os mesmos. Outras substâncias, no entanto, podem sofrer variações de acordo com valores de temperatura, tipo de coluna ou material de revestimento, dentre outros. Portanto, para outras substâncias, estes parâmetros sempre devem ser levados em consideração.

Para análises com programação de temperatura, condição essencial para boa separação de misturas complexas, Van den Dool e Kratz fizeram uma aproximação baseada na equação de Kováts. Para esta equação linear, foi dada o nome de índice de retenção linear (IRL ou IR) e é calculado segundo a equação 8, abaixo.

$$IRL = \frac{t_R X - t_R Z}{t_R Z+1 - t_R Z} + 100Z \quad \textbf{(Equação 8)}$$

Em que *IRL*: índice de retenção linear; $t_R$X: tempo de retenção da substância X; $t_R$Z: tempo de retenção do n-alcano Z eluindo antes da substância X; $t_R$Z+1: tempo de retenção do n-alcano Z eluindo após a substância X; n: número de átomos de carbono do n-alcano Z.

A proposição do índice por Kováts permitiu a organização de espectros de massas em base de dados de acordo com o índice de diversas substâncias voláteis. Desta forma, adicionou-se à análise mais um parâmetro que leva em conta a retenção da substância em dada condição cromatográfica para, associada à semelhança do espectro obtido, poder ser comparado com substâncias que possuem o mesmo comportamento cromatográfico.

## 5.4 Preparo de amostra

O sucesso da separação dos analitos dependerá, também, do preparo da amostra. Procedimentos inadequados podem levar a problemas de análise e no equipamento.

A injeção de amostra não volátil não permitirá a correta interpretação dos resultados analíticos e levará ao comprometimento do equipamento a longo prazo. O solvente utilizado para solubilizar a amostra não deve reagir com ela, deve ter elevado grau de pureza e ser volátil, para que seja vaporizado nas condições de análise. Os solventes orgânicos com baixo ponto de ebulição (hexano e diclorometano, por exemplo) são os recomendados para esta função.

Em alguns casos, os constituintes voláteis encontram-se solubilizados na matriz não-volátil, podendo-se empregar o método de extração/injeção por *headspace* que envolve a partição das substâncias voláteis entre a solução saturada de matriz não volátil e a fase gasosa acima desta solução. Ela pode ser estática ou dinâmica. Na extração estática, fibras adsorventes utilizadas em micro-extração em fase sólida (SPME, *solid phase micro-extraction*) são expostas no *headspace* para adsorver os constituintes voláteis e, em seguida, introduzidos no sistema cromatográfico. Exemplos de uso são demonstrados por Alissandrakis e colaboradores (2007) e Soria e colaboradores (2009) na separação

de constituintes voláteis do mel, como antranilato de metila, benzaldeídos, hexan-1-ol e fenilacetaldeído, provenientes de diferentes espécies de plantas (Alissandrakis *et al.*, 2007; Soria et al., 2009). Na extração por *headspace* dinâmica, o gás de arraste passa pelo *headspace* conduzindo diretamente a amostra para o cromatógrafo, como demonstrado por Şerban e colaboradores (2012) na separação de substâncias voláteis (α- e β-pineno e limoneno, dentre outras substâncias) de *Juniperus communis* L. e *Abies alba* Mill (Serban *et al.*, 2012).

## 5.5 Derivação

Alguns analitos apresentam características que inviabilizam sua análise por CG, como baixa volatilidade, volatilidade excessiva, dificuldade de detecção ou termolabilidade, dentre outras. Para contornar estes problemas, reações podem ser utilizadas para modificar a estrutura do analito, tornando-o analisável pela técnica, recebendo a denominação de reações de derivação. Existe uma gama de reações disponíveis para determinados grupos funcionais, que devem ser selecionadas de acordo com as características da análise (Birkemeyer, Kolasa & Kopka, 2003). As mais conhecidas são acilação, alquilação e sililação.

As reações de acilação são uma alternativa à sililação, nas quais os hidrogênios dos grupamentos -OH, -SH e -NH são convertidos em ésteres, tioésteres e amidas, respectivamente. As substâncias derivadas, assim como no caso da sililação, em geral são mais voláteis e menos polares, levando a uma melhora da qualidade do sinal. Um exemplo é a derivação do tebaol para análise por CG-EM, como descrito por Megutnishvili, Todua e Mikaia (2018).

Nas reações de alquilação, hidrogênios ativos são substituídos por grupos alifáticos ou alifático-aromáticos (benzila). Sua principal aplicação é na esterificação de ácidos orgânicos. O método de derivação por alquilação é demonstrado em Villas-Bôas e colaboradores (2011), que descreveram a derivação de ácidos orgânicos e aminoácidos para estudos de metabolômica.

As reações de sililação são as mais comuns e envolvem a troca de um hidrogênio ativo (como aqueles presentes em grupos -OH, -SH e -NH) por uma cadeia ligada a átomos de silício (R-Si). Com isso, são geradas substâncias de maior volatilidade e menor polaridade, reduzindo a interação com as porções não revestidas da coluna. Tais reações são usadas em diversas análises de produtos naturais, como na derivação de fito-hormônios descrita por Birkemeyer, Kolasa e Kopka (2003).

## 5.6 Isolamento de constituintes voláteis por CG

A obtenção de substâncias puras e isoladas é fundamental na pesquisa de produtos naturais, uma vez que se trabalha com matrizes complexas que contêm diversas substâncias de interesse.

A principal diferença do sistema cromatográfico preparativo é a existência de um módulo usado para coletar os efluentes, parte não incluída no equipamento analítico. No entanto, em escala preparativa, as modificações devem ser realizadas em cada uma das partes do sistema. O equipamento deve contar com injetores mais robustos, capazes de comportar, injetar e volatilizar quantidades maiores de amostra, pois sua vaporização incompleta pode levar à contaminação por substâncias que não volatilizaram por completo levando a perda de eficiência do método.

A sobrecarga de amostra pode resultar em uma separação deficiente das substâncias ou sinais mais largos que diminuem a resolução, como descrito por Dixon, Malone e Umbreit (1968) quando realizaram a separação e purificação de óleo de tangerina, notando a sobreposição de sinais ao elevar a quantidade de amostra injetada (Dixon, Malone & Umbreit, 1968). Portanto, a coluna deve ser capaz de garantir uma separação adequada, com suficiente resolução, para que se obtenha as substâncias isoladas. Neste contexto, esforços são feitos para aumentar a capacidade de carga das colunas, como aumentar seu diâmetro, demonstrado no isolamento de componentes voláteis (β-elemeno, curzereno, curzerenona etc.) do óleo essencial de *Curcuma rhizoma* por Yang e colaboradores em 2011, utilizando coluna empacotada com 10% OV-101 (metilsilicone) (Yang *et al.*, 2011). No trabalho de Rieck e König (1996) foi realizado o isolamento de álcoois furanoeudesmânicos do óleo essencial de *Lophocolea heterophylla*, com uma coluna empacotada com FE quiral contendo 6% *octakis*-(6-O-metil-2,3-di-O-pentil)-γ-ciclodextrina (Rieck & König, 1996).

O aumento do diâmetro interno da coluna pode levar à perda de eficiência e resolução na separação, causados pela falta de homogeneidade na transferência de calor para a coluna. Para transpor tais efeitos, foram desenvolvidas colunas com aquecimento interno e o uso de colunas analíticas em paralelo com uma coluna preparativa podem reduzir tempo e a perda na eficiência.

O uso de sistema de CG multidimensional preparativo (prep-MDGC), que combina diferentes tipos e tamanhos de colunas num mesmo equipamento ou em equipamentos distintos dispostos em série, tem demonstrado uma separação mais eficiente, particularmente para amostras complexas (Sciarrone *et al.*, 2015a). Mentol, acetato de linalila, carvona e geraniol têm sido purificados de óleos essenciais de hortelã-pimenta, hortelã e lavanda empregando esta técnica. Seu sucesso está associado a um coletor de frações, que deve ser eficiente de forma a garantir a obtenção das frações ao fim da separação.

Diferentes métodos estão disponíveis para a coleta das frações da amostra que podem utilizar a adsorção das substâncias, colunas revestidas com um filme mais espesso

que o normal e fibras sintéticas utilizadas em micro-extração em fase sólida, mantendo-as adsorvidas ao mesmo (Sciarrone *et al.*, 2015a). Estes materiais retêm as substâncias até que um método de dessorção seja utilizado, como: a) por calor, em que se injeta um fluxo de gás na armadilha enquanto ela é gradativamente aquecida, permitindo que as substâncias retidas sejam dessorvidas progressivamente; e b) por lavagem, na qual um fluxo de solvente é utilizado para remover as substâncias retidas na armadilha.

Muitas substâncias analisadas por CG são voláteis nas condições de análise, porém líquidas à temperatura ambiente e, portanto, podem ser condensadas pelo simples resfriamento como no método conhecido como armadilha de resfriamento (do inglês *Cold Trap*). O efluente da coluna é direcionado a uma bobina de vidro imersa em $N_2$, onde é condensado. As temperaturas da armadilha são diretamente relacionadas ao ponto de ebulição das substâncias de interesse, podendo variar desde a temperatura ambiente, para substâncias com alto ponto de ebulição, até o uso de $N_2$, para substâncias com baixo ponto de ebulição, como demonstrado por Özek e colaboradores (2012) no isolamento de monoterpenos do óleo de *Crinitaria tatarica*, empregando nitrogênio líquido (Özek *et al.*, 2012).

Outro método é o da captura do gás de saída em frascos, que usa equipamentos especialmente preparados para a coleta. Em alguns casos, são fabricados pela própria equipe de analistas, como descrito por Sciarrone e colaboradores (2013) (Sciarrone *et a*l., 2013).

No mercado existem diversos tipos de coletores de frações para equipamentos de CG, usando os mais diversos métodos de captura. A vantagem dos coletores comerciais é a praticidade, o interfaceamento com equipamentos de diversos fabricantes, a automatização da coleta, que permite a reprodutibilidade e confiabilidade e, principalmente, o fácil manuseio da amostra após a coleta.

A CG preparativa é empregada para a obtenção de diferentes substâncias voláteis puras, como: o carotol, um sesquiterpeno oxigenado presente no óleo de cenoura, descrito por Sciarrone e colaboradores (Sciarrone *et al.*, 2015b); o mentol e a mentona, terpenos presentes o óleo essencial da hortelã-pimenta (Park *et al.*, 2012). Porém, também é comum o uso de CG preparativa para concentrar amostras minoritárias em determinadas frações voláteis para permitir uma melhor análise posterior, como pode ser visto no mesmo trabalho citado acima.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento de produtos naturais é um grande desafio para o pesquisador e, para que obtenham sucesso, ele deve unir o conhecimento sobre a forma de obtenção do extrato vegetal, de seus possíveis constituintes químicos e as técnicas de separação disponíveis. A polaridade de um extrato pode ser determinada pela técnica de extração escolhida, p. ex.: destilação por arraste a vapor promove a separação dos constituintes voláteis (mono/sesquiterpenos e fenilpropanoides; baixa polaridade), extração ácido-base favorece a extração de substâncias ionizáveis (alcaloides; média polaridade), maceração/percolação com soluções hidroalcoólicas extrai todas as classes presentes na matéria-prima vegetal (de baixa a alta polaridade), partição líquido-líquido de extratos brutos com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol; baixa a alta polaridade). A solubilidade da amostra é que determinará, a escolha pelo método cromatográfico a ser utilizado para resolvê-la. Inicialmente, sempre será realizada a análise por CCD para obter informações mínimas, porém cruciais para as próximas etapas que tenham maior poder resolutivo e geram maior riqueza de informações sobre a amostra. Dentre elas, encontram-se a CLAE (para substâncias fixas) e a CG (para substâncias voláteis e volatilizáveis), acopladas a detectores que garantirão informações adicionais quanto as classes que a constituem. A partir daí, será escolhida a técnica e o procedimento a serem utilizados para o isolamento da substância-alvo, análise estrutural e estudos sobre atividade biológica e beneficiamento farmacotécnico.

# REFERÊNCIAS


ADLARD, E. R. 50 Years of gas chromatography. Chromatographia, 57: S13-S18, 2003.

ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P. C. *et al.* Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. J*ournal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8152–8157, 2007.

ALI, S., ASHRAF-KHORASSANI, M., TAYLOR, L. T., AGAH, M. MEMS-based semi-packed gas chromatography columns. Sensors and Actuators B: Chemical, 141:309-315, 2009.

ANNANG, F., PÉREZ-MORENO, G., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R. *et al.* High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease. *Journal Biomolecular Screening*, 20(1): 82-91, 2015.

ATANASOV, A.G., WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E-M *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plantderived natural products: A review. *Biotechnology Advances,* 33(8): 1582–1614, 2015.

ATTIMARAD, M., AHMED, K.K.M., ALDHUBAIB, B.E. *et al.* High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharmaceutical Methods*, 2: 71-75, 2011.

AUBIN, A., CLEARY, R. Analytical HPLC to preparative HPLC: scale-up techniques using a natural product extract. Waters Corporation, Milford, 2009.

BALEKUNDRI, A., MANNUR, V. Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review. *Future Journal Pharmaceutical Sciences* 6: 67, 2020.

BERTHOD, A., MARYUTINA, T., SPIVAKOV, B.Y. *et al.* Countercurrent chromatography in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 81: 355-387, 2009.

BIRKEMEYER, C.; KOLASA, A.; KOPKA, J. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. Journal of Chromatography A, 993: 89-102, 2003.

BLUMBERG, L.M. Theory of Fast Capillary Gas Chromatography Part 4: Column Performance *vs.* Lquid Film Thickness, *Journal of High-Resolution Chromatography*, 22(9):501-508, 1999.

BOUSLIMANI, A., SANCHEZ, L.M., GARG, N. *et al.* Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Natural Product Reports,* 31: 718-729, 2014.

BUCAR, F., WUBE, A., SCHMID, M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, 30: 525-545, 2013.

BUTNARIU, M. Methods of analysis (extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products. *Journal of Ecosystem & Ecography*, 6: 1-19, 2016.

CHAO, C.H., CHENG, J.C., GONÇALVES, T.P. *et al.* Glaulactams A-C, daphniphyllum alkaloids from *Daphniphyllum glaucescens*. *Scientific Reports*, 8: 15417, 2018.

CHEN, J.J., LEE, H.H., DUH, C.Y. *et al.* Cytotoxic chalcones and flavonoids from the leaves of *Muntingia calabura*. *Planta Medica,* 71: 970-973, 2005.

CHEN, Q., HU, X., LI, J. *et al.* Preparative isolation and purification of cuminaldehyde and p-menta-1,4-dien-7-al from the essential oil of Cuminum cyminum L. by high-speed counter-current chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 689: 149-154, 2011

CIMPAN, G., GOCAN, S. Analysis of medicinal Plants by HPLC: Recent approaches. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25: 2225–2292, 2002.

ÇITOGLU, G.S., ACIKARA, O.B. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. *Chromatography and its applications*, 1:13-50, 2012.

COLLINS, C.H. Michael Tswett e o “nascimento” da cromatografia. *Scientia chromatographica*, 1: 7-20, 2009a.

COLLINS, C.H. Os primórdios da cromatografia líquido-líquido. *Scientia chromatographica*, 1: 7-10, 2009b.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas. Editora da Unicamp, 1ª edição, 2006.

CONWAY, W. D. Countercurrent Chromatography and High-Speed Countercurrent Chromatography: Instrumentation. In: Wilson, I. D., editor, Encyclopedia of Separation Science. Academic Press; London: 2000, pp. 365-374.

COSTA, F.N., LEITÃO, G.G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, 33: 336-347, 2010.

CRAGG, G.M., GROTHAUS, P.G., NEWMAN, D.J. New horizons for old drugs and drugs leads. *Journal of Natural Products*, 77: 703-723, 2014.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Ed. Fundação Calouste Gulbenkian,3ª edição, 2000.

CRAIG, L. C. Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. II. Separation by counter-current distribution. *Jornal of Biological Chemistry*, 155:519 –534, 1944.

CRAIG, L. C., POST, O. Apparatus for Countercurrent Distribution. *Analytical Chemistry,* 21: 500-504, 1949.

CSERHÁTI, T., FORGÁCS, E. Liquid chromatographic separation of terpenoid pigments in foods and food products. *Journal of Chromatography A*, 936: 119-137, 2001.

CUI, H. Y., JIA, X. Y., ZHANG, X. *et al.* Optimization of high-speed counter-current chromatography for separation of polyphenols from the extract of hawthorn (*Crataegus laevigata*) with response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 77: 269-274, 2011.

DANG, Y.Y., LI, X.C., ZHANG, Q.W. *et al.* Preparative isolation and purification of six volatile compounds from essential oil of *Curcuma wenyujin* using high-performance centrifugal partition chromatography. *Journal of Separation Science*, 33:1658-1664, 2010.

DA SILVA, C.G.A., COLLINS, C.H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova,* 34: 665-676, 2011.

DEAN, J.R. **Classical Approaches for Aqueous Extraction**. In: J.R. Dean, Extraction Techniques in Analytical Sciences. West Sussex: John Wiley and Sons, 2009. cap 2, p. 39-47.

DIXON, C. O.; MALONE, C. T.; UMBREIT, G. R. A scheme for the preparative chromatographic isolation and concentration of trace components in natural products using 4-inch diameter columns. *Journal of Chromatography*, 35: 475-488, 1968.

DRAGALIN, I.; ARICU, A.; CIOCARLAN, N. *et al.* Analysis of the essential oil of *Satureja Subspicata* Bartl. Ex Vis. of Moldovan Origin. *Chemistry Journal of Moldova*, 11: 105-108, 2017.

EWING, G.W. Métodos Instrumentais de Análise Química. São Paulo: Editora Blucher, 1ª edição, 1972.

EISENSTEIN, M. Microarrays: Quality control. *Nature*, 442: 1067-1070, 2006.

EMERY, F.S., MARCHETTI, J.M. Farmacognosia. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1ª edição, 2017.

FANG, L., ZHANG, H., ZHOU, J. *et al.* Rapid screening and preparative isolation of antioxidants from *Alpinia officinarum* hance using HSCCC coupled with DPPH-HPLC assay and evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 17:1-6, 2018.

FENG, W., ZHU, X., ZHANG, L., GENG, X. Retention behaviour of proteins under conditions of column overload in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 729: 1-2, 43-47, 1996.

FERNANDES, M.R., PEDROSO, A.R. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Revista Associação Medica Brasileira*, 63 (11): 923-928, 2017.

FIEHN, O., KOPKA, J., DORMANN, P., ALTMANN. T., TRETHEWEY, R. N., WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18: 1157-1161, 2000.

FRIESEN, J. B, PAULI, G. F. Generally useful estimate of solvent systems for CCC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28: 2777-2806, 2005.

GAUDÊNCIO, S.P., PEREIRA, A.F. Dereplication: Racing to speed up the natural products discovery process. *Natural Product Reports,* 32: 779-810, 2015.

GERLICH, M., NEUMANN, S. MetFusion: integration of compound identification strategies. *Journal of Mass Spectrometry*, 48: 291-298, 2013.

GROB, R.L., BARRY, E.F. Modern Practice of Gas Chromatography, Hoboken:, *Wiley Interscience*, 4ª edição, 2004.

GUILLARME, D., NGUYEN, D.T-T., RUDAZ, S., VEUTHEY, J-L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 66: 475-482, 2007.

HALKET, J. M., ZAIKIN, V.G. Analyte derivatization strategies for GC–MS. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*, 8: 61-85, 2006.

HARVEY, A.L., EDRADA-EBEL, R., QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews - Drug Discovery*, 14: 111-129, 2015.

HO, T.-J.; HUNG, C.-C.; SHIH, T.-L. *et al.* Investigation of borneols sold in Taiwan by chiral gas chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26:348–352, 2018.

HUANG, J., XU, X., XIE, C.*et al.* Isolation and purification of paeoniflorin and albiflorin from radix *Paeoniae rubra* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36: 419-427, 2013.

HUANG, X.-Y, IGNATOVA, S., HEWITSON, P., DI, D.-L. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 77: 214–225, 2016.

HUBERT, J., NUZILLARD, J.M., RENAULT, J.H. Dereplication strategies in natural product research: how many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews*, 16: 55-95, 2017.

HUSSAIN, N., JABEEN, Z., LI, Y., CHEN, M., LI, Z., GUO, W., SHAMSI, I. H., CHEN, X., JIANG, L. Detection of tocopherol in Oilseed Rape (*Brasssica napus* L.) using gas chromatography with flame ionization detector. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5):803-814, 2013.

ITO, T., MASUBUCHI, M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *The Journal of Antibiotics*, 67: 353-360, 2014.

ITO, Y., BOWMAN, R. L. Countercurrent Chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. Journal of Chromatographic Science, 8: 315-323, 1970.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065:145-168, 2005.

ITO, Y. pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications. *Journal of Chromatography A*, 1271:71-85, 2013.

IZUMI, Y., LAVIÑA, W.A., PUTRI, S.P. Sample Preparation. In: PUTRI, S.P, FUKUSAKI, E., editors. Mass spectrometry-based metabolomics - a practical guide. CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton: 2015. pp. 37-102.

JANDERA, P., KOMERS, D., GUIOCHON, G. Effects of the gradient profile on the production rate in reversed-phase gradient elution overloaded chromatography. *Journal of Chromatography A,* 760: 25-39, 1997.

JIN, G., GUO, Z., XIAO, Y. *et al.* Practical method for the definition of chromatographic peak parameters in preparative liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 39: 3917-3926, 2016.

KEARNEY, S.E., ZAHORÁNSZKY-KŐHALMI, G., BRIMACOMBE, K.R. *et al.* Canvass: A Crowd-Sourced, Natural-Product Screening Library for Exploring Biological Space. *ACS Central Science*, 26 (12): 1727-1741, 2018.

KOVÁTS, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7): 1915-1932, 1958.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26: 739-753, 2018.

KILDGAARD, S., SUBKO, K., PHILLIPS, E., *el al.* Dereplication and Bioguided Discovery Approach to Reveal New Compounds from a Marine-Derived Fungus Stilbella fimetaria. *Marine Drugs*, 15: 253-272, 2017.

KIM, H. K., VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*, 21: 4-13, 2010.

KHODDAMI, A., WILKES, M.A., ROBERTS, T.H. Technique for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375, 2013.

KOEHN, F. E. High impact technologies for natural products screening. *Progress in Drug Research*, 65: 177–210, 2008.

KOEHN, F.E., CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews – Drug Discovery*, 4: 206-220, 2005.

KRISHNAN, P., KRUGER, N.J., RATCLIFFE, R.G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, 56: 255-265, 2005.

LANÇAS, F.M.; A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? *Scientia Chromatographica*, 1: 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? *Scientia Chromatographica*, 3: 17-23, 2011.

LAGE, G.A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

LAI, Z., FIEHN, O. Mass spectral fragmentation of trimethylsilylated small molecules. *Mass spectrometry reviews*, 37: 245-257, 2018.

LEITÃO, G.G.; EL-ADJI, S.S.; DE MELO, W.L.; LEITÃO, S.G.; BROWN, L. Separation of Free and Glycosylated Flavonoids from Siparuna guianensis by Gradient and Isocratic CCC. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, 28: 2041-2051, 2005.

LI, J., ZHANG, X., YU, Q. *et al.* One-step separation of four flavonoids from herba *Salviae Plbeiae* by HSCCC. *Journal of Chromatographic Science*, 52:1288-1293, 2014.

LIU, Y., FRIESEN, J.B., MCALPINE, J.B. *et al.* Solvent system selection strategies in countercurrent separation. *Planta Medica*, 81:1582-1591, 2015.

LOBIŃSKI, R., SIDELNIKOV, V., PATRUSHEV, Y., RODRIGUEZ, I., WASIK, A. Multicapillary column gas-chromatography with element-selective detection. *Trends in analytical chemistry*, 18(7):449-460, 1999.

LOPES, E.T., NETO, M.A., SILVEIRA, E.R. *et al.* Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunt. *Química Nova*, 35:2169-2172, 2012.

LU, Y., WU, N., FANG, Y. *et al.* An automatic on-line 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-high performance liquid chromatography method for high-throughput screening of antioxidants from natural products. *Journal of Chromatography A*, 27:100-109, 2017.

MARGRAFF, R. Preparative centrifugal partition chromatography In: Foucault, A., editor. Centrifugal partition chromatography (chromatographic science series, vol. 68). Marcel Dekker; New York: 1994. pp. 331-350.

MARKLEY, J.L., BRUSCHWEILER, R., EDISON, A.S. *et al.* The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43:34-40, 2017.

MARTIN, A.P.J., SYNGE, R.L.M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*, 35: 1358-1368, 1941.

MEGUTNISHVILI, L.; TODUA, N.; STEIN, S.; MIKAIA, A. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of thebaol, an opium constituent, and its structural analogs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 157:116–121, 2018.

MISHRA, K. P., GANJU, L., SAIRAM, M., BANERJEE, P. K., SAWHNEY, R. C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 62: 94-98, 2008.

MOROS, G., CHATZIIOANNOU, A.C., GIKA, H.G. *et al.* Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. *Bioanalysis*, 9: 53–65, 2017.

MUZITANO, M.F., FALCÃO, C.A., CRUZ, E.A. *et al.* Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Planta Medica*, 75: 307-311, 2009.

MUZITANO, M.F., TINOCO, L.W., GUETTE, C. *et al.* The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67:2071-2077, 2006.

NETO F.C., PILON, A.C., SELEGATO, D.M. *et al.* Dereplication of natural products using GC-TOF mass spectrometry: improved metabolite identification by spectral deconvolution ratio analysis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3: 1-13, 2016.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83: 770-803, 2020.

NIELSEN, K. F., SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002: 111-136, 2003.

OKA, F., OKA, H.; ITO, Y. Systematic search for suitable 2-phase solvent systems for high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A*, 538:99-108, 1991.

ÖZEK, G., ISHMURATOVA, M., TABANCA, N. *et al.* One-step multiple component isolation from the oil of *Crinitaria tatarica* (Less.) Sojak by preparative capillary gas chromatography with characterization by spectroscopic and spectrometric techniques and evaluation of biological activity. *Journal of Separation Science*, 35:650-660, 2012.

PARK, H. E., YANG, S., HYUN, S., PARK, S. J., CHOI, H., MARRIOTT, P. J. Simple preparative gas chromatographic method for isolation of menthol and menthone from peppermint oil, with quantitative GC-MS and (1)H NMR assay. *Journal of Separation Science*, 35(3):416-423, 2012.

PEDERSEN, M.M., CHUKWUJEKWU, J.C., LATEGAN, C.A. *et al.* Antimalarial sesquiterpene lactones from *Distephanus angulifolius*. *Phytochemistry*, 70:601-607, 2009.

PETRUCZYNIK, A. Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. *Central European Journal of Chemistry*, 10:802-835, 2012.

PINTO, S. C. Estudo químico e biológico de componentes voláteis de *Anemia tomentosa* var. anthriscifolia (Schard.) Mickel e *Anemia raddiana* Link. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de janeiro. P.143. 2008.

PYRZYNSKA, K., SENTKOWSKA, A. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45:41-51, 2015.

RAMOS, A. C., OLIVEIRA, R. R. A new alkaloid and flavonoids isolated from *Solanum cernuum* leaves by high-performance countercurrent chromatography, *Natural Product Research*, 31:2405-2412, 2017.

REID, V. R., SYNOVEC, R. E. High-speed gas chromatography: The importance of instrumentation optimization and the elimination of extra-column band broadening. *Talanta*, 76:703-717, 2008.

RICKL, V., BLADT, S. Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas. Heidelberg: Springer, 2ª edição, 2009.

RIECK, A., KÖNIG, W. A. Furano-eudesma-4(15),7,11-trien-5α-ol from the liverwort *Lophocolea heterophylla*. *Phytochemistry*, 43:1055-1056, 1996.

RODRIGUES, A.M., GUIMARÃES, D.O., KONNO, T.U. *et al.* Phytochemical study of *Tapirira guianensis* leaves guided by vasodilatory and antioxidant activities. *Molecules*, 22:1-12, 2017.

ROESSNER, U., WAGNER, C., KOPKA, J., TRETHEWEY, R. N., WILLMITZER, L. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal*, 23: 131-142, 2000.

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*, 21: 33-47, 2010.

SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 906:275-299, 2001.

SCIARRONE, D.; PANTÒ, S.; RAGONESE, C. *et al.* Evolution and status of preparative gas chromatography as a green sample-preparation technique. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71: 65-73, 2015a.

SCIARRONE, D., PANTÒ, S., CACCIOLA, F., COSTA, R., DUGO, P., MONDELLO, L. Advanced preparative techniques for the collection of pure components from essential oils. *Natural volatiles & Essential Oils*, 2(2):1-15, 2015b.

SCIARRONE, D.; PANTÒ, S.; ROTONDO, A. *et al.* Rapid collection and identification of a novel component from *Clausena Lansium* skeels leaves by means of three-dimensional preparative gas chromatography and nuclear magnetic resonance/infrared/mass spectrometric analysis. *Analytica Chimica Acta*, 785: 119-125, 2013.

SERBAN, E. S.; SOCACI, S. A.; TOFANA, M. *et al.* Advantages of "Headspace" technique for GC/MS analysis of essential oils. *Farmacia*, 60:249-256, 2012.

SCHELLINGER, A.P., CARR, P.W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *Journal of Chromatography A*, 1109: 253-266, 2006.

SHI, X., WANG, X., WANG, D. Separation and purification of α-cyperone from *Cyperus rotundus* with supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation of Science and Technology*, 44: 712-721, 2009.

SHULAEV, V., CORTES, D., MILLER, G., MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia plantarum*, 132: 199-208, 2008.

SILVA, D.B., MATOS, M.F.C., NAKASHITA, S.T. *et al.* Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos de Annonaceae. *Quimíca Nova,* 30: 1809-1812, 2007.

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. Princípios de Análise Instrumental, 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., DOLAN, J.W. Introduction to modern liquid chromatography, Third Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, 3ª edição, 2010.

SOGA, T., OHASHI, Y., UENO, Y., NARAOKA, H., TOMITA, M., NISHIOKA, T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2: 488-494, 2003.

SORIA, A. C.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Study of the precision in the purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, 1216:3300–3304, 2009.

SOUSA, A.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J.A. Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. *Journal of Separation Science*, 35:3046-3058, 2012.

TANIMURA, T., PISANO, J. J., ITO, Y. *et al.* Droplet countercurrent Chromatography. *Science*, 169:54-56, 1970.

TSWETT, M. Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft,* 24: 316-323, 1906a.

TSWETT, M. Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft,* 24: 384-393, 1906b.

TURNBULL, J.E., MILLER, R.L., AHMED, Y. *et al.* Glycomics profiling of heparan sulfate structure and activity. *Methods in Enzymology*, 480: 65-85, 2010.

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *Journal Chromatography A*, 11: 463-471, 1963.

VANZOLINI, K.L.; DA F. SPRENGER, R.; LEME, G.M. *et al.* Acetylcholinesterase affinity-based screening assay on *Lippia gracilis* Schauer extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 153:232-237, 2018.

VIEIRA, M. N., LEITÃO, S. G., PORTO, P. C. C. *et al.* Application of pH-zone-refining countercurrent chromatography for the separation of indole alkaloids from *Aspidosperma rigidum* Rusby. *Journal of Chromatography A*, 1319:166–171, 2013.

VILLAS-BÔAS, S.G., SMART, K.F., SIVAKUMARAN, S., LANE. G.A. Alkylation or silylation for analysis of amino and non-amino organic acids by GC-MS?. *Metabolites*, 1(1):3-20, 2011.

Wang, M., Carver, J., Phelan, V. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34: 828-837, 2016.

WEI, Y., DU, J., LU, Y. Preparative separation of bioactive compounds from essential oil of *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze using steam distillation extraction and one step high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 35:2608–2614, 2012.

WELLER, M.G. A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*, 12: 9181-9209, 2012.

WOLFENDER, J. L., TERREAUX, C., HOSTETTMANN, K. The Importance of LC-MS and LC-NMR in the Discovery of New Lead Compounds from Plants. *Pharmaceutical Biology*, 38: 41-54, 2000.

WOLFENDER, J-L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. *Planta Medica*, 75: 719-734, 2009.

XIE, J., WANG, S., SUN, B., ZHENG, F. Preparative separation and purification of β-caryophyllene from leaf oil of *Vitex negundo* L. var. heterophylla (Franch.) Rehd. by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31: 2621-2631, 2008.

YAN, J., CHEN, G., TONG, S. *et al.* Preparative isolation and purification of germacrone and curdione from the essential oil of the rhizomes of *Curcuma wenyujin* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1070: 207-210, 2005.

YANG, F. Q., WANG, H. K., CHEN, H. *et al.* Fractionation of volatile constituents from Curcuma rhizome by preparative gas chromatography. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2011: 1-6, 2011.

YANG, J. Y., SANCHEZ, L. M., RATH, C. M. *et al.* Molecular Networking as a dereplication strategy. *Journal of Natural Products*, 76: 1686-1699, 2013.

YAO, Y., CHENG, Z., YE, H. *et al.* Preparative isolation and purification of anti-tumor agent ansamitocin P-3 from fermentation broth of *Actinosynnema pretiosum* using high-performance counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 33:1331-1337, 2010.

YE, H., CHEN, L., LI, Y., PENG, A. *et al.* Preparative isolation and purification of three rotenoids and one isoflavone from the seeds of *Millettia pachycarpa* benth by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1178:101-107, 2008.

ZHOU, Y., WANG, C., WANG, R., LIN, L., YIN, Z., HU, H. Preparative separation of four sesquiterpenoids from Curcuma longa by high-speed counter-current chromatography. Separation Science and Technology, 52(3): 497-503, 2017.

**CRISTIANE CATELA MARTINS DE JESUS:** Farmacêutica pelo Instituto de Ciências Farmacêuticas UFRJ-Macaé. Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências – UFRJ-Macaé. Farmacêutica Hospitalar.

**DANIEL LUIZ REIS SIMAS:** Químico Industrial pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, mestre em Química pelo Instituto de Química – UFRJ e doutor pelo Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais – UFRJ e pós-doutor pela Faculdade de Farmácia – UFRJ. Responsável técnico e sócio cofundador da Bio Assets.

**DENISE OLIVEIRA GUIMARÃES:** Farmacêutica pela Universidade Federal de Goiás, mestre pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP/USP). Doutora pela FCFRP/USP com estágio no Massachusetts General Hospital - Harvard University - Boston/MA/USA. Pós-doutora pela FCFRP/USP com estágio na The Rockefeller University – New York/NY/USA. Professora Associada no Instituto de Ciências Farmacêuticas – UFRJ-Macaé.

**FERNANDO ARMANI AGUIAR:** Farmacêutico Industrial pela Universidade Federal de Ouro Preto. Mestre e doutor pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Professor adjunto do Instituto Multidisciplinar de Química – UFRJ-Macaé.

**MARCOS VINICIUS TOLEDO E SILVA:** Farmacêutico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências – UFRJ-Macaé. Farmacêutico na Central Análitica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos – FF-UFRJ.

**MICHELLE FRAZÃO MUZITANO:** Farmacêutica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Doutora pelo Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais – UFRJ com estágio na Università Degli Studi di Firenze – Itália. Pós-doutora no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ. Professora Associada no Instituto de Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências – UFRJ-Macaé e no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRJ.

**NATALIE GIOVANNA DA ROCHA XIMENES:** Farmacêutica pela Instituto de Ciências Farmacêuticas UFRJ-Macaé. Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências – UFRJ-Macaé. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRJ.

**SHAFT CORRÊA PINTO:** Farmacêutico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Mestre e doutor pelo Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais – UFRJ. Pós-doutor pela Faculdade de Farmácia – UFRJ. Professor Associado no Instituto de Ciências Farmacêuticas e no Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências – UFRJ-Macaé.

**THIAGO BARTH:** Farmacêutico Industrial e mestre pela Universidade Federal de Santa Maria. Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências

Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto com estágio na Universidade de Cádiz-Espanha. Professor Associado no Instituto de Ciências Farmacêuticas e no Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências – UFRJ-Macaé.

**WILLIAN JONIS ANDRIOLI:** Farmacêutico Industrial pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Mestre pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP/USP). Doutor pela FCFRP/USP com estágio no The University of Mississippi (National Center of Natural Products Research) - Oxford/MS/USA. Professor Associado no Instituto de Ciências Farmacêuticas – UFRJ-Macaé.




www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br


# Isolamento de produtos naturais do metabolismo secundário


Atena Editora
Ano 2023



www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

# Isolamento de produtos naturais do metabolismo secundário

Atena Editora
Ano 2023